Vergleichende genetische und biochemische Untersuchungen zur DNA-Verpackung an natürlichen und induzierten Varianten des Phagen P22 von Salmonella typhimurium

Jean Bernhard Petri

DIsbui. München
1987

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vergleichende genetische und biochemische Untersuchungen zur DNA-Verpackung an natürlichen und induzierten Varianten des Phagen P22 von Salmonella typhimurium

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Jean Bernhard Petri

aus Paris

Mai 1987

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 1982 bis November 1986 am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Horst Schmieger durchgeführt.

1. Berichterstatter: Professor Dr. Horst Schmieger
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Werner Lubitz

Tag der mündlichen Prüfung:

Johanna
und meinen Lehrern
gewidmet

Alle Prüfung, alles Bekräften und Entkräften einer Annahme geschieht schon innerhalb eines Systems. Und zwar ist dies System nicht ein mehr oder weniger willkürlicher und zweifelhafter Anfangspunkt aller unserer Argumente, sondern es gehört zum Wesen dessen, was wir Argument nennen. Das System ist nicht so sehr der Anfangspunkt, als das Lebenselement der Argumente. - Wer an allem zweifeln wollte, der würde auch nicht bis zum Zweifel kommen. Das Spiel des Zweifelns setzt selbst schon die Gewißheit voraus. - Ja, der Zweifel beruht nur auf dem, was außer Zweifel ist.

Ludwig Wittgenstein

Denken und Wissen sollten immer gleichen Schritt halten. Das Wissen bleibt sonst tot und unfruchtbar.

Wilhelm von Humboldt

0. Inhaltsübersicht

		Seite
0.	Inhaltsverzeichnis	5
1.	Einführung	9
2.	Abkürzungen	21
3.	Medien, Puffer, Chemikalien, Radiochemikalien und Enzyme	22
3.1	Medien	22
3.2	Häufig verwendete Puffer	22
3.3	Chemikalien, Radiochemikalien und Enzyme	23
4.	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	23
4.1	Bakterienstämme	23
4.1.1	Salmonella typhimurium	23
4.1.2	Escherichia coli	23
4.2	Bakteriophagen	24
4.2.1	Phagen von S.typhimurium	24
4.2.2	M13mp-Phagen und pUC-Plasmide	24
4.3	neukonstruierte Plasmide	25
5.	Methoden	28
5.1	Biologische Methoden	28
5.1.1	Übernachtkulturen / Bestimmung von Phagentitern	28
5.1.2	Vermehren und Konzentrieren von Phagen	28
5.1.2.1	Phagen von S.typhimurium	28
5.1.2.2	Vermehrung von M13mp-Phagen	28
5.1.3	Transduktionen	29
5.1.3.1	Transduktion bakterieller Marker	29
5.1.3.2	erf Transduktion unter recA Bedingungen	30
5.2	Biochemische Methoden	30
5.2.1	Isolierung von Phagen-DNA	30
5.2.2	Präparation von Plasmid-DNA	30
5.2.2.1	Alkalische Lyse von Bakterien	30
5.2.2.2	Präparation von Plasmiden für Klonierung, Sequenzierung und "nick Translationen"	31
5.2.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
5.2.4	Gelelektrophorese	32
5.2.4.1	Agarosegelelektrophorese	33
5.2.4.2	Sichtbarmachen von DNA-Fragmenten	33
5.2.4.3	Polyacrylamidgele	34
5.2.4.3.1	native PAA-Gele	34
5.2.4.3.2	Proteingele	34
5.2.4.3.3	Denaturierende PAA-Harnstoffgele	34
5.2.4.4	Bestimmung der Fragmentgrößen	34
5.2.4.5	Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Gelen	35
5.2.5	Ligierung von DNA-Fragmenten	35
5.2.6	Transformation von Bakterien	35
5.2.6.1	Transformation mit Plasmiden	35
5.2.6.2	Transformation mit M13-Phagen	35
5.2.7	Nick-Translation	36
5.2.8	DNA-DNA Hybridisierungsmethoden	36
5.2.9	Erzeugung von M13-Klonen zur Sequenzierung mit Exonuklease III	37
5.2.10	DIGE	38
5.2.11	DNA-Präparation zur Sequenzierung	38
5.2.11.1	Präparation von Template-DNA zur M13-Sequenzierung	38
5.2.11.2	Präparation von Plasmid-DNA zur Sequenzierung	39

5.2.12 Sequenzierung von DNA....39
5.2.12.1 DNA-Sequenzierung nach Sanger....39
5.2.12.1.1 Annealing (ssDNA)....39
5.2.12.1.2 Denaturierung und Annealing von dsDNA....39
5.2.12.2.1 Sequenzreaktionen (M13-DNA)....40
5.2.12.2.2 Sequenzreaktionen (pUC-DNA)....41
5.2.12.3 DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert....41
6. Computerunterstützte DNA-Analyse....41
7. Ergebnisse....42
7.1 Allgemeine biologische Charakterisierung....42
7.1.1 Morphologie....43
7.1.2 Immunität....45
7.1.3 Transduktionsexperimente....47
7.1.4 Marker rescue Experimente....50
7.2 Allgemeine biochemische Charakterisierung....53
7.2.1 Proteinmuster....53
7.2.2 Restriktionsmuster von Phagen-DNA....53
7.3 Spezielle Untersuchungen an dem Phagen LP7....58
7.3.1 Plaquevariabilität bei LP7....58
7.3.2 sie System bei LP7....59
7.3.3 DNA-Analyse von LP7....60
7.3.4 erf recA Transduktionsexperimente....61
7.3.5 Untersuchung der PstI-Fragmente C, D1 und D2....67
7.3.6 Subklonierung von D1 und D2....69
7.4 DNA-Sequenzanalysen....70
7.4.1 DNA-Sequenz der Gene 3 und 2 70
7.4.2 DNA-Sequenz von pGM4004....79
7.4.3 Sequenzierung von HT-Mutanten von P22....81
7.5 Computerunterstützte Analyse der gefundenen DNA- und Proteinsequenzen....83
8. Diskussion der Ergebnisse....92
8.1 Transduktion bakterieller Marker....92
8.2 Immunität....93
8.3 Marker rescue Experimente....94
8.4 Sequenzanalysen....96
8.4.1 Modelle für die Interaktion von Genprodukt 3 mit pac 96
8.4.2 Vergleich der Situation bei P22 mit der Terminasefunktion von Lambda....98
8.4.3 Typen DNA-bindender Proteine....101
8.5 Analyse und Vergleich von gp3 bei P22, P22 HT-Mutanten und LP7....102
8.5.1 Signalelemente der Translation....102
8.5.2 pac Signal-abhängige Transduktion; grobe Lokalisierung des Signals....103
8.5.3 Bestimmung der pac Signalsequenz....105
8.5.4 Plasmidtransduktion....107
8.5.5 Vergleich der Genprodukte 3....109
8.5.6 Genprodukt 2(LP7) und LP7ORF1; Pst-D1 und D2....111
9. Zusammenfassung....114
10. Literaturverzeichnis....117

Verzeichnis der Abbildungen

Fig. 1a Vergleich der Genkarten von Lambda und P22
Fig. 1b Restriktionskarte von P22
Fig. 1c Darstellung von konkatemerer P22-DNA
Fig. 2 Neukonstruierte pGM-Plasmide
Fig. 3 EM-Aufnahmen von Salmonella-Phagen
Fig. 4a Proteinmuster von Salmonella-Phagen
Fig. 4b PstI-Restriktionsmuster von Salmonella-Phagen
Fig. 4c Vergleich LP7 PstI D1 und D2
Fig. 4d Hybridisierung von pGM4004 mit LP7- und P22-DNA
Fig. 5a Polylinkerregion von M13mp18/19
Fig. 5b Erzeugung von M13-Klonen zur Sequenzierung
Fig. 6 Spaltung von LP7 DNA mit Restriktionsendonukleasen
Fig. 7a Sequenzierungsstrategie EcoRV-Fragment von LP7
Fig. 7b Sequenzierungsstrategie pGM4004
Fig. 7c Sequenzierungsstrategie TaqI-Fragment von HT-Mutanten
Fig. 8 DNA- und Proteinsequenz LP7 Gen 3, 2 und ORF1
Fig. 9 DNA-Sequenz von pGM4004 und Punktmatrixvergleich
Fig. 10 Vergleich von Genprodukt 3-Sequenzen
Fig. 11 Sekundärstrukturvorhersagen für gp3
Fig. 12 Hydrophilizitätsgraphen von gp3 und gpNu1
Fig. 13 Hydrophilizitätsgraphen von gp2 und gpA
Fig. 14 Punktmatrixvergleich von Gen 2 mit Gen A
Fig. 15 Punktmatrixvergleich Gen 3 / Gen Nu1
Fig. 16 Konsensus pac-Sequenz

1. EINFÜHRUNG

Für die Entwicklung der molekularen Genetik sind die Bakteriophagen von kaum zu überschätzender Bedeutung.

Die (molekulare) Biologie steht im Vergleich zu anderen Naturwissenschaften vor der Tatsache, daß sie es mit vergleichsweise komplizierten Objekten, nämlich lebenden Organismen, zu tun hat. Ihr Ziel ist es, physikalisch-chemische Gesetzmäßigkeiten mit für Organismen typischen Phänomenen wie Vererbung und Informationsübertragung im weiteren Sinne oder der phänotypischen Expression zu verknüpfen. Die belebte Materie ist aufgrund ihrer Komplexität experimentellen Ansätzen und der Modellbildung verhältnismäßig schwer zugänglich. Bakteriophagen bieten nun den (relativen) Vorteil, daß sie im Labor aufgrund ihres Aufbaus und Lebenszyklus' erheblich leichter faßbar sind als "höher" organisierte Lebewesen, was mit für die Erfolge der molekularen Genetik von Bakteriophagen seit einigen Jahrzehnten verantwortlich ist. Die haploide Struktur des Genoms, eine hohe Reproduktionsrate, übersichtliche Wirtssysteme und das Fehlen eines eigenen Stoffwechsels prädestinieren sie geradezu für grundlegende Experimente.

Nach einer Phase, in der das Interesse an Bakteriophagen zugunsten einer verstärkten Zuwendung zu eukaryontischen Systemen (bei denen selbstverständlich die mit Phagen gewonnenen Erkenntnisse einen wertvollen Grundstock bilden) etwas nachgelassen hatte, deutet seit einigen Jahren wieder manches hin auf eine gewisse Renaissance der Phagenforschung gerade bei Fragestellungen, für die eukaryontische Systeme nach wie vor zu kompliziert sind. Insbesondere sind solche Interessen bei eher "nicht-klassischen" Bakteriophagen von *Salmonella typhimurium*, Streptomyceten oder *Bacillus subtilis* verstärkt zu beobachten.

Es gibt eine Reihe temperenter, allgemein transduzierender und miteinander mehr oder weniger eng verwandter Bakteriophagen des Bakterienstammes *Salmonella typhimurium*, von denen P22 (Zinder und Lederberg, 1952) der bei weitem bestuntersuchte Vertreter ist. Boyd (1950) hat nach der Untersuchung von 598 Klinikproben Salmonella-Phagen mit

doppelsträngiger DNA in zwei große Gruppen A und B eingeteilt. Die Unterscheidung erfolgt hauptsächlich nach den beiden Kriterien "Hitzeresistenz" und "Plaquemorphologie". Zur Gruppe A zählen hitzestabile Phagen mit großen, trüben Plaques, zur Gruppe B hitzelabile Phagen mit kleinen Plaques.

Neben P22, der zur Gruppe A gehört, ist der Phage L (Bezdek und Amati, 1967) aus verschiedenen Gründen (vor allem wegen der besonders großen Ähnlichkeit zu P22) noch relativ gut untersucht, während über zahlreiche andere Typ A-Phagen von Salmonella typhimurium wie A1a, A2f, A3 (Boyd, 1950), ES18 und eine Wirtsbereichsmutante ES18h1 (Kuo und Stocker, 1970), LP7 (Kitamura und Mise, 1970) und die Typ B-Phagen KB1 und eine integrationsdefekte Mutante KB1int (Boro und Brenchley, 1971) nur sehr vereinzelte Daten vorliegen. Diese Daten geben ausschließlich über biologische Eigenschaften jener Phagen Auskunft und stammen entweder noch von den Erstbeschreibern (vor allem die Phagen der "A" Gruppen: Boyd 1950; Boyd und Bidwell 1957; Callow 1959) oder beziehen sich auf einen einzelnen Aspekt des betreffenden Phagen (z.B. Transduktionsraten von "rough" Markern durch ES18h1: Sanderson und Roth, 1983).

Die letzte bekanntgewordene Arbeit, die - freilich nicht in ihrer Hauptintention - einen Vergleich mehrerer Phagen von Salmonella typhimurium unternimmt, stammt von Kinkeldey et al. (1978). Hierin wird im Vergleich zu P22 das unterschiedliche Verhalten von elf Salmonella Phagen gegen zwei Modifikations - Restriktionssysteme des Wirtes untersucht. Kinkeldey kommt zu dem Schluß, daß die Empfindlichkeit der einzelnen Phagen für ein Restriktionssystem nicht eindeutig mit dem jeweiligen Verwandtschaftsgrad zu P22 korreliert ist.

Der überwiegende Teil der verfügbaren Daten weist auf ein gemeinsames Merkmal dieser Phagen hin: es handelt sich um eine Gruppe von einander sehr ähnlichen Phagen, die sich jeweils nur in bestimmten Einzelmerkmalen unterscheiden. Daher konzentriert sich der Großteil des wissenschaftlichen Interesses stellvertretend für die ganze Salmonella typhimurium Phagengruppe auf P22.

Eine wissenschaftshistorische Parallele stellen die

lambdoiden Phagen von Escherichia coli dar. Auch dort geben verwandte Phagen wie Ø80, 21 oder 434 im wesentlichen nur im Vergleich zum Phagen Lambda (z.B. hinsichtlich des "origin of replication" oder der Immunität) ein interessantes Objekt ab.

Zwei voneinander unabhängige Interessen und Ergebnisse aus den letzten Jahren bei der Untersuchung von Phagen (insbesondere der P22-Gruppe) führten jedoch dazu, den Blickpunkt nicht mehr ausschließlich auf P22 zu richten, sondern sich auch der Untersuchung P22-verwandter Phagen mehr zu widmen. Bei den zwei Interessengebieten handelt es sich einmal um Modellüberlegungen zur Evolution von Bakteriophagen, zum anderen um einen Vergleich der Art, wie bei verschiedenden Bakteriophagen die Verpackung von DNA in die Proheads getriggert wird.

Der eine Anstoß, sich vergleichend mit mehreren Phagen zu befassen, kommt aus einem neu entstandenen Interesse an der Evolution von Bakteriophagen und zwar insbesondere am evolutiven Entstehen der lambdoiden Phagengruppe (Szybalski und Szybalski, 1974; Botstein und Herskovitz, 1974; Botstein, 1980; Campell und Botstein, 1983). Es gibt eine Reihe von Befunden, die Botstein schließlich veranlassen, eine Theorie vom sogenannten "modularen" Aufbau von Bakteriophagen aufzustellen, wobei er den Begriff "Modul" von Szybalski (1974) entlehnt.

a) Ein Vergleich der Genkarten von Lambda (und seinen nahe verwandten Phagen Ø80, 21, 82, 434) mit der von P22 (Susskind und Botstein, 1978) zeigt eine nachgerade frappierende Übereinstimmung beinahe aller Gene in ihrer relativen Kartenposition (Fig. 1), obwohl sich beispie[illegible] die Strukturgene von Lambda und P22 für den Schwanza[illegible] vollkommen unterscheiden. Die funktione[illegible] räuml[illegible] "Zusammenfassung" zu Gengruppen ("ganz [illegible]" "späte" Gene) ist bei beiden Phagengruppen

RIJKS. UNIV. LEIDEN BIBL.

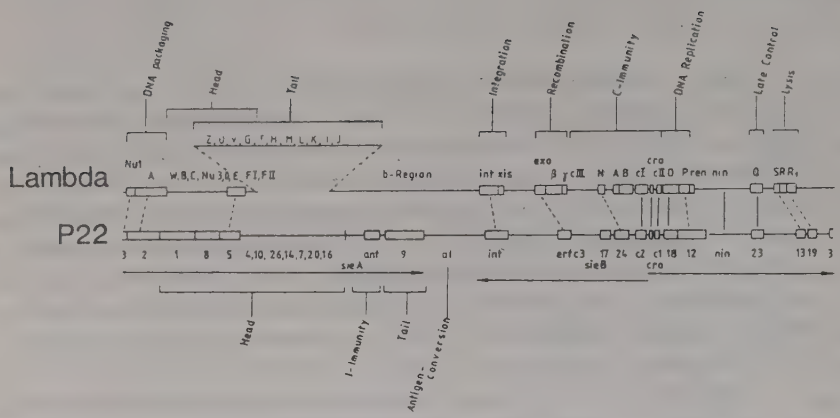


Fig.1a. **Vergleich der Genkarten von Lambda und P22** (nach Backhaus, 1984). Bei Lambda wird die Genanordnung auf dem ca. 48.5 kb langen Chromosom des reifen Phagen (zwischen den cos Enden) gezeigt. Nach der publizierten DNA-Sequenz (Sanger et al., 1982) sind Größe und Lage wichtiger Gene eingezeichnet. Entsprechend wird das ca. 42.5 kb lange Genom von P22 durch die Stelle der Verpackungsinitiation (pac) begrenzt. Lage und Größe der P22-Gene folgen den publizierten Werten von Rutila und Jackson (1981). Gestrichelte Verbindungslinien zwischen Genen oder Gengruppen weisen auf funktionelle Analogien hin; bei durchgezogenen Linien ist (mindestens teilweise) Sequenzhomologie nachgewiesen. Mit den Pfeilen unterhalb der P22-Genkarte sind die Haupttranskriptionsgruppen bei P22 angedeutet.

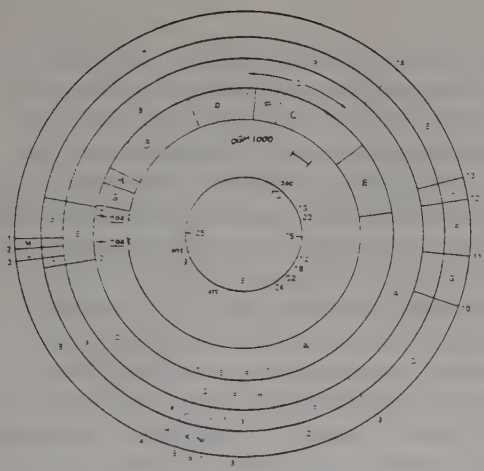


Fig. 1b.

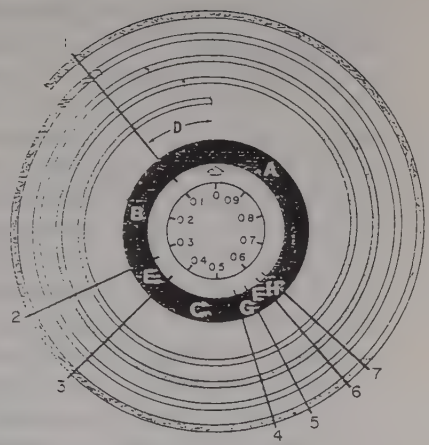


Fig. 1c.

Fig. 1b. **Spaltstellen in P22-DNA** von HindIII (äußerer Kreis) und EcoRI (dritter Kreis) in Korrelation zur genetischen Karte (innerer Kreis). Das EcoRI-Fragment D ist ein Teilfragment von EcoRI A und tritt als Folge der Initiation des Verpackungsvorganges an pac in substöchiometrischen Mengen (siehe Fig. 4b) auf, da nur die ersten Headful-Moleküle an dieser Stelle starten (nach Deans und Jackson, 1978). Entsprechend geht dieses Fragment nicht in die Berechnung des Molekulargewichtes ein. Im vierten Kreis sind die Spaltstellen von PstI angegeben. Außerdem ist der Abschnitt von P22, der in dem Plasmid pGM1000 kloniert ist, eingetragen.

Fig. 1c. **Ausschnitt aus einem Konkatemer von P22-DNA**, in der Darstellung einer Spirale um die zirkuläre EcoRI-Restriktionskarte. Die Verpackung der DNA beginnt an pac (nach Jackson et al., 1982).

Selbst die Lage der Gene A und Nu1 bzw. 2 und 3, deren Produkte mit der Erzeugung der molekularen Genomenden und dem Start der DNA-Verpackung zu tun haben, ist vollständig homolog. Die Funktionsweise dieser Proteine ist hinsichtlich der Erzeugung der molekularen Enden allerdings wesentlich verschieden, was daran zu erkennen ist, daß eine sequenzspezifische cos site wie bei dem Phagen Lambda bei P22 nicht beobachtet wird.

b) Es ist leicht möglich, hybride Phagen zu erzeugen. Als einige von vielen Beispielen seien genannt: P22::L-Hybride, Lambda::Ø80-Hybride, die wechselseitig die Immunitätsregion oder die Replikationsgene O und P (Furth und Yates, 1978) ausgetauscht haben, Lambda::L-Hybride (Hilliker, 1981) oder auch Lambda::P22-Hybride (Botstein und Herskowitz, 1974; Hilliker und Botstein, 1976; Schanda-Mulfinger und Schmieger, 1980), welche z.B. die frühen Gene einschließlich der Replikationsgene oder auch nur die Replikationsgene ausgetauscht haben. Interessant an diesen Lambda::P22-Hybriden ist, daß es offenbar nur eine begrenzte Anzahl von (Re-)Kombinationsmöglichkeiten gibt, was z.B. daran zu sehen ist, daß alle gefundenen Lambda-Hybride, die nur die Replikationsgene von P22 enthalten, ihre linke Rekombinationsstelle zwischen dem Lambda-Gen cII und dem Start des P22-Genes 18 im Bereich der oop RNA haben (Schanda-Mulfinger, 1979). Nur ein einziger Hybridphage (hy9P) wurde von Schanda-Mulfinger gefunden, der als Besonderheit ein hybrides Gen O/18 aufweist (Backhaus und Petri, 1984). Die Genprodukte 18 und 12 bzw. O und P stellen eine funktionelle Einheit dar, wobei gpO bzw. gp18 mit dem jeweiligen Origin und spezifisch mit gpP bzw. gp12 interagieren, während diese den Kontakt zu wirtskodierten Replikationsfaktoren wie dnaB vermitteln (Klinkert und Klein, 1979; Furth und Wickner, 1983; Zahn und Blattner, 1985). Daher bestehen erst rechts von diesen Genen (in der sogenannten ninR Region) Rekombinationsmöglichkeiten, die zu lebensfähigen Hybridphagen führen.

Der Vergleich der Primärstruktur von Lambda im Bereich der frühen Gene bis einschließlich der ninR Region (Sanger et al., 1982; Grosschedl und Hobom, 1979; Kröger und Hobom, 1982) mit der entsprechenden Primärstruktur von P22

(Backhaus und Petri, 1984) unterstützt die Hypothese von Botstein, weil er zeigt, daß gerade die intergenischen Bereiche, in denen sich die Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen Phagen häufig ereignen, in ihrer Primärstruktur (mindestens über Streckenabschnitte von mehr als 30 Basenpaaren) erstaunlich homolog sind (den Befund mit dem Wort "konserviert" wiederzugeben, würde einen Zirkelschluß implizieren), während die entsprechenden Gene 18 und O bzw. 12 und P selbst keine nennenswerten Sequenzhomologien aufweisen. Normalerweise erfolgt eine Selektion gerade auf die Funktion, was die Konservierung von kodierenden Bereichen begünstigt oder geradewegs erfordert.

Aufgrund dieser und ähnlicher Befunde formuliert Botstein (1980) als wesentliche Bestandteile der modularen Theorie der Evolution von Bakteriophagen folgende Kriterien:

1) Das Produkt der Evolution ist nicht ein fertiger Phage, sondern eine "Familie" wechselseitig austauschbarer genetischer Elemente ("Module"), die jeweils eine bestimmte biologische Funktion tragen. Bei Modulen kann es sich um funktionelle Domänen, Gene oder auch Gruppen von Genen mit den entsprechenden Signalen handeln. Der Austausch eines bestimmten Moduls gegen ein anderes der gleichen biologischen Funktion geschieht durch homologe Rekombination. Durch "artspezifische" Module können Phagen der gleichen Gruppe sich trotzdem soweit voneinander unterscheiden, daß sie ganz verschiedene Wirte benutzen, die nur noch vergleichsweise fern verwandt sind (z.B. *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*).

2) Die Evolution neuer Phagen ereignet sich nicht vornehmlich durch einzelne Mutationsereignisse auf der Ebene des intakten Phagen, sondern auf der Ebene einer Neukombination von funktionellen Einheiten, den Modulen. Die Selektion dieser Module geschieht nach den folgenden drei Kriterien: a) gute Funktionalität; b) Vorhandensein flankierender Sequenzhomologien an den Modulrändern zur homologen Rekombination an den passenden Stellen in den Phagengenomen (die Bezeichnungen "linker"; Botstein (1980) und "vehors"; Backhaus und Petri (1984) meinen das gleiche); c) funktionelle Kompatibilität, die maximale Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Modulen und korrekte Regulierbar-

keit erlaubt.

Als Beispiel für ein derartiges Modul sei die Lysisfunktion als Schlußpunkt der Phagenvermehrung genannt. Für den biologischen Effekt spielt es keine Rolle, auf welchem biochemischen Weg die Wirtszellwand permeabel für die reifen Phagen wird. Tatsächlich beobachtet man einerseits starke Ähnlichkeiten der Lysozyme so verschiedener Phagen wie P22 und T4 (Weaver et al., 1985) und anderseits starke funktionelle Unterschiede bei gleicher Position im Genom (P22 und Lambda: Wiggins und Hilliker, 1985a).

Botstein dehnt seine Theorie auch auf die Viren bei Eukaryonten aus. Denn auch bei animalen Viren gibt es Befunde (z.B: Heteroduplexanalysen), die denen bei Bakteriophagen ähneln. Auch solche Viren könnten in der Evolution als eine Population wechselseitig austauschbarer Module entstanden sein.

Es bleibt freilich noch, diese Theorie im Detail eingehender zu belegen. So gibt es kaum genaue Daten über den Austausch von Modulen zwischen einzelnen Phagen von Salmonella typhimurium . Ein Problem der Botsteinschen Theorie bildet die Tatsache, daß man beim jetzt beobachtbaren Stand der Evolution einen Modulaustausch zwischen Phagen von Escherichia coli und Salmonella typhimurium nur mit genetisch ausgeklügelten Verfahren studieren kann, weil er durch die relative Ferne der beiden Bakterienstämme in natura kaum vorkommen kann. Es wäre jedoch leicht möglich, viele Ereignisse eines Modulaustausches zwischen Phagen des gleichen Wirtes zu untersuchen. Hier bietet sich die große Anzahl klassifizierter Phagen von Salmonella (vergl. S.10) geradezu an. Die Beantwortung der Frage, ob es auch einen Modulaustausch zwischen Phagen der Typen A und B gibt, könnte die Entstehungsgeschichte beider Phagenklassen ganz wesentlich erhellen. In der vorliegenden Arbeit werden einige Daten gezeigt, die Hinweise auf den Weg zur Beantwortung der Frage nach der molekularen Evolution von (einigen) Bakteriophagen geben können.

Der zweite oben erwähnte Anstoß, sich mit verschiedenen Phagen von Salmonella typhimurium zu befassen, kommt von der eingehenden Untersuchung der Initiation der Verpackung von DNA in die Phagenköpfe bei P22 und der Suche nach dem Startsignal der Verpackung, der sogenannten pac site (Jackson et al., 1978; Strobel, 1981; Schmidt und Schmieger, 1984; Backhaus, 1985). Die physiko-chemischen Mechanismen der DNA-Verpackung sind bis jetzt nicht voll verstanden; es wurde jedoch in den letzten Jahren viel zu ihrem besserem Verständnis beigetragen. Insbesondere die Zahl und Art der beteiligten Proteine dieses vergleichsweise komplizierten Prozesses konnten in einigen Fällen (Lambda, T4, P22) wesentlich erhellt werden. Beim Verpackungsprozeß und der Kondensation der DNA von P22 sind die Produkte der Gene 1, 2, 3, 5 und 8 erforderlich. Gp1, 5 und 8 werden zum Aufbau der "Prohead" genannten Vorläuferstrukturen des reifen Kopfes benötigt, während gp2 und 3 nur an der Verpackung selbst teilnehmen.

Bei P22 besteht die DNA im reifen Phagenpartikel aus einem linearen Doppelstrang von 42.5 kb, was etwa 103 % der Gesamtgenomlänge entspricht. Die terminale Redundanz von 3 % stammt aus unterschiedlichen, aber begrenzten Bereichen des Genoms, was zu einer zirkulären Permutation der DNA-Sequenzen in einer Population reifer Phagen-DNA-Moleküle führt (Rhoades et al., 1968; Tye et al., 1974b; Jackson et al., 1978). Nach der Infektion des bakteriellen Wirtes werden Konkatemere aus Phagen-DNA über Rekombination und phagenkontrollierte Replikation synthetisiert (Botstein, 1968; Botstein und Matz 1970; Weaver und Levine, 1977a,b). Diese Konkatemere stellen das Substrat der DNA-Verpackung in die vorher bereitgestellten "Proheads" dar ("Phagenreifung"; Poteete und King, 1977). Das sog. "Headful"-Modell von Streisinger (ursprünglich für die DNA-Verpackung des virulenten Phagen T4 in die Diskussion eingeführt; Streisinger et al., 1967) erklärt die Einheitslänge der reifen Phagen-DNA-Moleküle dadurch, daß die Kapazität des Phagenkopfes die Länge der verpackbaren DNA bestimmt. Es wurde gezeigt, daß Deletionen im Phagengenom zu einer Verlängerung der terminalen Redundanz führen (Streisinger et al., 1967). Dieses Modell kann allerdings nicht entscheiden,

ob die DNA irgendwo zufällig oder durch einen gerichteten Prozeß an definierten Stellen aus dem Konkatemer gespalten wird. Tye et al. (1974a,b) konnten experimentell durch Denaturierungskartierung direkt nachweisen, daß das "Headful"-Modell auch für P22 zutrifft und daß in Wildtyp P22-Lysaten die terminale Redundanz nur über etwa 20 % der Genomlänge verteilt ist. Als Erklärung dafür setzte sich das Modell einer "sequentiellen Headful-Verpackung" (Tye et al., 1974b) durch. Dieses Modell postuliert, daß der Verpakkungsprozeß an einer definierten Stelle beginnt und danach in einer Richtung sequentiell verläuft, so daß der Endschnitt nach dem ersten "Headful"-Molekül den Start des zweiten erzeugt und so weiter. Daraus folgt, daß die Spezifität der Verpackung von P22 nur in der spezifischen Initiation liegt. Für diese Spezifität spricht auch der Befund von Schmieger (1972), daß Phagen-DNA hundertmal besser verpackt wird als bakterielle DNA, obwohl beide DNA-Typen annähernd äquimolar vorliegen.

Den genetischen Ort der Initiation der Verpackung des ersten "Headfuls" lokalisieren mehrere Autoren unabhängig voneinander im Bereich des Genes 3 (Waever und Levine, 1978; Kufer et al., 1982), also gerade innerhalb eines der Gene, dessen Genprodukt durch eine Wechselwirkung mit einem Signal in der DNA-Sequenz (Poteete und Botstein, 1979) an der Initiation der DNA-Verpackung beteiligt ist. Daß dies bei Phagen nicht so ungewöhnlich ist, wurde für die Position des "origin of replication" (ori) bei Lambda (Moore et al., 1977, 1979; Hobom et al., 1979; Tsurimoto und Matsubara, 1981) und P22 (Petri und Backhaus, 1984) nachgewiesen. Auch dort liegt die Signalstruktur innerhalb der kodierenden Sequenz der Genprodukte von Gen O bzw. 18 , welche die jeweiligen Signale erkennen.

Jackson und Mitarbeiter (1978) bestimmen durch Restriktionskartierung mit EcoRI den Bereich der Schnittstelle des ersten "Headfuls" und nennen sie pac site. Später wurde gezeigt, daß eine pac site in vivo eine notwendige Voraussetzung für den Start der Verpackung ist (Schmieger, 1984), während in vitro keine Notwendigkeit nachgewiesen werden konnte (Behnisch et al., 1985), sondern wahrscheinlich nur ein freies Strangende der zu verpackenden

DNA erforderlich ist (Orbach und Jackson,1982). Mit einer genaueren Restriktionskartierung zeigen Casjens und Huang (1982), daß innerhalb eines Bereiches von etwa 120 Basenpaaren mindestens sechs verschiedene Typen von molekularen Enden auftreten. Backhaus (1985) beobachtet, daß in der Tat die molekularen Enden der Schnittfragmente nicht einheitlich sind. Beispielsweise ist das daran zu erkennen, daß alle vier Basen A, C, G und T bei einer Bestimmung der Endnukleotide auftreten. Eine noch eingehendere Untersuchung des fraglichen Bereiches im Gen 3 bis hin zur DNA-Sequenzierung und einem computergestützten Vergleich mit dem analogen Gen Nu1 von Lambda (Backhaus, 1985) führen zur Kenntnis einer Fülle weiterer Details und der kodierenden Sequenz des Genes 3 . Das eigentliche pac Signal, also die spezifische Erkennungsstelle auf der P22 DNA, von wo aus die Genprodukte gp2 und gp3 die DNA-Verpackung beginnen, läßt sich jedoch entgegen der ursprünglichen Hoffnung allein aus der DNA-Sequenz (trotz der intensiven Suche nach charakteristischen Merkmalen wie "inverted" und "direct repeats", Palindromen nach dem Muster der Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen etc.) nicht exakt bestimmen.

Es lassen sich jedoch zwei einander ergänzende Strategien denken, mit deren Hilfe man am Ende die genaue Sequenz der pac site von P22 und überhaupt allgemeinere Kriterien für eine pac site erhalten wird.

Der erste Weg, den ich hier als den "vertikalen Weg" bezeichnen möchte, besteht darin, den fraglichen Bereich der pac Region immer weiter durch Klonierung von Subfragmenten und anschließende biologische Tests nach einer pac site immer weiter eingrenzen, bis man schließlich zu einer minimalen pac site von P22 gelangen wird.

Der andere Weg, der entsprechend als der "horizontale Weg" zu bezeichnen wäre, vergleicht eine Vielzahl von pac sites verschiedener Herkunft mit der Absicht, gemeinsame Merkmale zu finden, die dann eine Bestimmung der jeweiligen minimalen pac site gestatten. Zu dieser Vielzahl gehören einmal die "echten" pac sites von Phagen, die mit P22 verwandt sind und einen ähnlichen Verpackungsmechanismus, aber eine andere Spezifität besitzen. Dazu gehören auch möglicherweise die sogenannten HT-Mutanten von P22

(Schmieger, 1971; 1972), die dadurch ausgezeichnet sind, daß die DNA-Verpackung weniger spezifisch ist und die Diskriminierung zwischen DNA des Phagen und des Wirtes deutlich weniger ausgeprägt ist.

Zum anderen sind "Quasi pac sites" von Interesse, die zur Entstehung transduzierender Phagenpartikel beitragen. Das Phänomen der Entstehung transduzierender Partikel, bei der einzelne bakterielle Marker unterschiedlich häufig anstelle der DNA des Phagen verpackt werden, läßt sich dadurch erklären, daß auch auf dem bakteriellen Chromosom pac site-ähnliche Bereiche vorkommen, die von den Phagen sozusagen "irrtümlich" zur Initiation der Verpackung benutzt werden. Durch genaueres Untersuchen solcher bakterieller pac sites ließen sich im Vergleich zu der eingegrenzten Region von P22 Aussagen über die allgemeine Beschaffenheit einer pac site und eventuell auch über qualitative Merkmale machen.

Neben dem allgemeineren Interesse dieser Arbeit, verschiedene Bakteriophagen von Salmonella typhimurium mit genetischen und biochemischen Methoden genauer zu charakterisieren, bietet sich natürlich der "horizontale Weg" geradzu an. Ein Ziel dieser Arbeit ist also, Signale, die zur Initiation der Verpackung führen, bei anderen Phagen zu suchen und danach möglichst genau einzugrenzen. Da die Suche nach pac sites in genetisch bislang weitgehend unbekannten Phagen nicht trivial ist, scheint eine Beschränkung der Suche auf wenige pac sites (oder pac site-ähnliche Signale) sinnvoll, damit diese dann um so eingehender untersucht werden können.

2. Abkürzungen

A	Adenosin
ap(R)	Ampicillin (Resistenz)
AmAc	Ammoniumacetat
b(p)	Basen(paare)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cm(R)	Chloramphenicol (Resistenz)
(d)dNTP	(Di)desoxynukleotidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
dH_2O	destilliertes und deionisiertes Wasser
ds/ ssDNA	doppelstängige/einzelsträngige DNA
DTT	1.4-Dithiothreit
EB	2.7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
EtOH	Ethanol
G	Guanosin
gpX	Genprodukt des Genes X
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
(m)(u)L	(milli)(mikro) Liter
(m)M	(milli) Molar
min	Minute(n)
m.o.i.	multiplicity of infection
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
O.D.	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglykol
RF	replikative Form (z.B. von M13-Phagen)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat-Puffer
tc(R)	Tetracyclin (Resistenz)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
T	Thymin
U	Enzymeinheit (Unit)
ÜK	Übernachtkultur
VF	Verdünnungsflüssigkeit
Vol	Volumina
v/v	Volumen/Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
XC	Xylencyanol FF
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galactopyranosid

3. MEDIEN, PUFFER, CHEMIKALIEN, RADIOCHEMIKALIEN UND ENZYME

3.1 Medien

Medien wurden mit vollentsalztem, Puffer mit destilliertem und Puffer für DNA-Arbeiten mit quarzdestilliertem Wasser angesetzt.

LB-Medium (Miller, 1972) diente als Standard-Vollmedium und setzte sich aus Difco Yeast Extract (0.5 %), Difco Bacto Tryptone (1 %) und NaCl (0.5 %) zusammen.
M9-Minimalmedium (Miller, 1972) enthielt NaH_2PO_4 x 12 H_2O (1.5 %), KH_2PO_4 (0.3 %), NaCl (0.1 %) und NH_4Cl (0.1 %).
Nach dem Autoklavieren wurden $MgSO_4$ (0.025 %), Glucose (0.2 %) und Thiamin-HCl (5 ug/mL) supplementiert.
Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1.5 % Difco Bacto Agar, Weichagar (WA) zum Überschichten von Platten 0.7 % Agar.

3.2 Häufig verwendete Puffer

Lambda-Puffer	
TRIS-HCl pH 7.4	50 mM
$MgSO_4$	10 mM

TE-Puffer	
TRIS-HCl pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM

TAE-Puffer	
TRIS pH 8.3	40 mM
NaAc	20 mM
EDTA	1 mM
EB	0.4 ug/mL

TBE-Puffer (Peacock und Dingmann, 1968)	
TRIS-Borat pH 8.3	100 mM
EDTA	1 mM

10x Phosphatase-Puffer	
Glycin-NaOH pH 9.5	500 mM
$MgCl_2$	1 mM
$ZnCl_2$	0.1 mM
Glycerin	30 % (v/v)

10x Nick translation-Puffer	
$MgCl_2$	60 mM
TRIS-HCl	400 mM
DTT	100 mM

Farbmarker für native DNA-Gele	
BPB	0.05 % (w/v)
XC	0.05 % (w/v)
EDTA	10 mM
Ficoll	40 % (v/v)
Harnstoff	3 M

Farbmarker für Sequenzgele	
BPB	0.05 % (w/v)
XC	0.05 % (w/v)
EDTA	10 mM
deion. Formamid	99 % (v/v)

10x Ligase-Puffer		äquilibriertes Phenol	
TRIS-HCl pH 7.6	660 mM	redestill. Phenol	
$MgCl_2$	50 mM	TRIS-HCl pH 8.0	1 M
DTT	50 mM	8-Hydroxychinolin	0.1 %(w/v)
ATP	10 mM		

20x SSC pH 7.2		VF	
NaCl	3 M	Bacto Tryptone	0.1 % (w/v)
Natriumcitrat	300 mM	NaCl	1 % (w/v)

3.3 Chemikalien, Radiochemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden im allgemeinen von den Firmen E. Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (München), Biorad (Richmond, Ca., U.S.A.) oder Baker (Deventer, NL) bezogen. Radiochemikalien stammten von den Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig) und New England Nuclear (Dreieich). Restriktionsenzyme und DNA modifizierende Enzyme wurden von Boehringer Mannheim und in einigen Fällen von Renner (Dannstadt), New England Biolabs (Schwalbach/Ts.) und Pharmacia (Freiburg/Br.) geliefert.

4. BAKTERIENSTÄMME, BAKTERIOPHAGEN UND PLASMIDE

4.1 Bakterienstämme

4.1.1 *Salmonella typhimurium*

NAME	GENOTYP, KURZBESCHREIBUNG,	QUELLE
DB21	prototropher Wildtyp	Labor
LT-2	prototropher Wildtyp	Labor
CC4423	hsd $(r^- m^-)$, *strR*	Colson
CC4412	$proC90^{SA70}$ *hsd* $r-_{LT,SA}$, *hsd* $m+_{LT,SA}$ *strR*	Colson
CC4412recA	wie CC4412, zusätzlich *recA*	Labor
su70	*cys* su^+	Labor
his	$hisB22^{am}$, auxotroph für Histidin	Labor

4.1.2 *Escherichia coli*

NAME	GENOTYP, KURZBESCHREIBUNG,	QUELLE
490A	*recA* *rpsL* (=strA) *lac* *met* *thi* *leu*	Hobom
JM83	*ara* *Δ(lac-proAB)* *rpsL* Ø80 lacZ M15	Messing
JM101	*supE* *thi* F'(traD36, proAB, $laqI^qZ$ M15)	Messing

JM105 thi rpsL endA sbcB15 hspR4 Δ(lac-proAB)
F'(traD36, proAB lacI^{q}Z M15) Messing

JM109 recA1 endA gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1
Δ(lac-proAB) F'(traD36, proAB, lacI^{q}Z M15)
Messing

Lysogene Stämme sind folgendermaßen gekennzeichnet: Bakterienstamm::lysogener Phage (z.B. DB21::LP7). Bei plasmidtragenden Stämmen steht der Name des Plasmids in Klammern nach der Stammbezeichnung (z.B. JM83(pGM4001)).

4.2 Bakteriophagen

4.2.1 Phagen von S.typhimurium

BEZEICHNUNG	KURZBESCHREIBUNG, QUELLE
H1	P22 c+ , Wildtyp (A Phage), Labor
H5	P22 c2 , Klarplaquemutante, Repressor defekt, Labor
HT12/4	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin-induzierte Mutante von H5 mit erhöhter Transduktionshäufigkeit (Schmieger, 1971)
HT13/4	wie HT12/4
HT17/1	wie HT12/4
HT103/2	wie HT12/4, aber Mutante von H1
HT102/3	wie HT103/2
L	Wildtyp, A Phage (Bezdek und Amati, 1967)
LP7	Wildtyp, A Phage (Kitamura und Mise, 1970)
ES18h1	host range Mutante von ES18, A Phage (Kuo und Stocker, 1970)
KB1	Wildtyp, B Phage (Boro und Brenchley, 1971)
A1a	Wildtyp, A Phage (Boyd, 1950)
A2f	Wildtyp, A Phage (Boyd, 1950)
A3	Wildtyp, A Phage (Boyd, 1950)

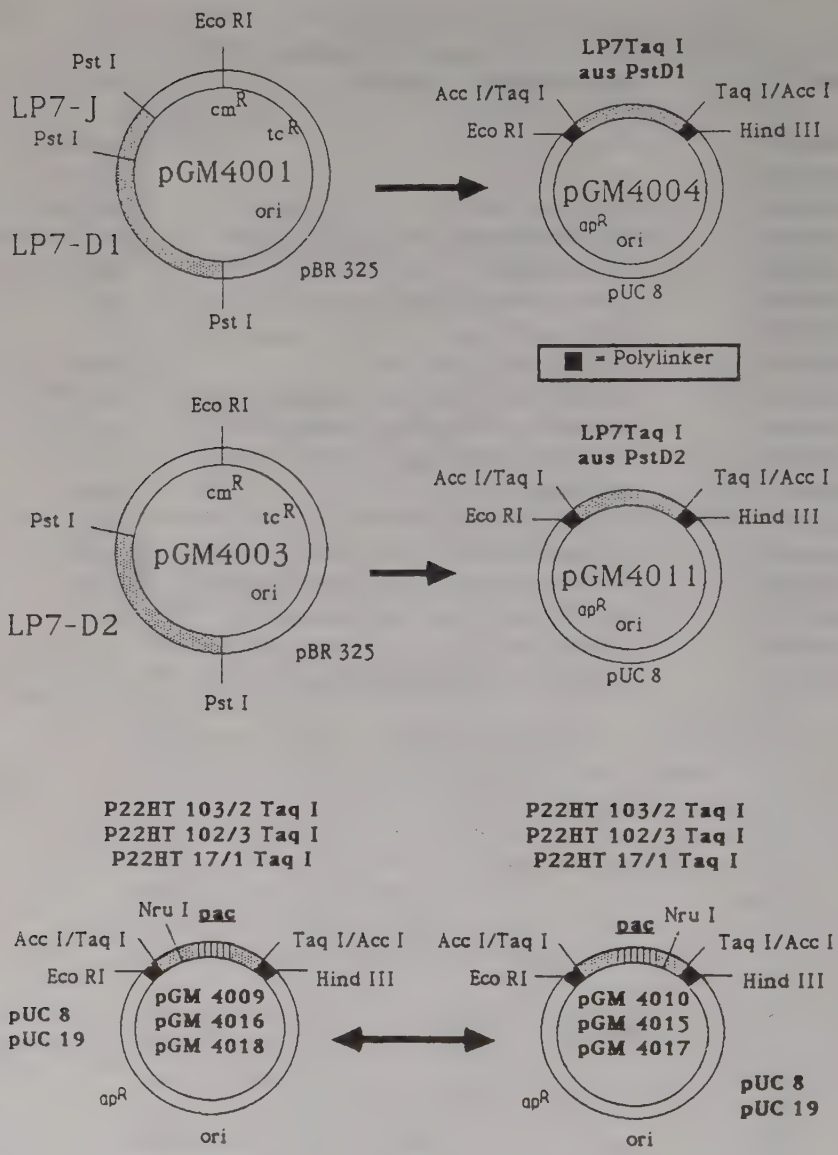
4.2.2 M13mp-Phagen, pUC-Plasmide und sonstige Plasmide

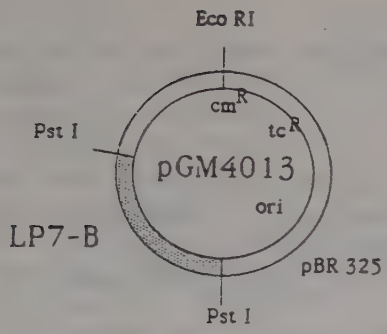
M13mp18W	Yanisch-Perron et al., 1985
M13mp19W	Yanisch-Perron et al., 1985
pUC8	Vieira und Messing, 1982
pUC18	Norrander et al., 1983
pUC19	Norrander et al., 1983
pGM1000	Strobel et al., 1984 (enthält Gen 3 von P22)
pPST-8	Schmidt und Schmieger, 1984 (PstI-C von P22)

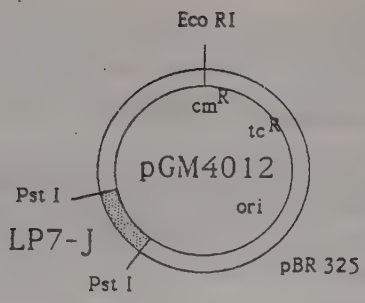
4.3 In dieser Arbeit konstruierte Plasmide (Fig. 2)

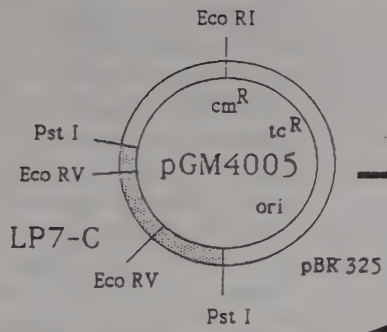
Name	inseriertes Fragment	Vektor
pGM4001	LP7 PstI D1+J	pBR325
pGM4002	LP7 PstI D1	pBR325
pGM4003	LP7 PstI D2	pBR325
pGM4004	LP7 400bp-TaqI-Fragm. aus D1	pUC8
pGM4005	LP7 PstI C	pBR325
pGM4006	LP7 EcoRV Pos.1-412 (Gen3 part.)	pUC8
pGM4007	LP7 EcoRV Pos.316-2110 (Gen2 part.)	pUC8
pGM4008	LP7 EcoRV 1 aus PstI-C	pUC8
pGM4009	P22HT103/2 TaqI aus SmaI-B (+)	pUC19
pGM4010	P22HT103/2 TaqI aus SmaI-B (-)	pUC19
pGM4011	LP7 TaqI-Fragment aus PstI D2	pUC8
pGM4012	LP7 PstI J	pBR325
pGM4013	LP7 PstI B	pBR325
pGM4014	LP7 EcoRV Pos.1-495 (Gen3 part.)	pUC19
pGM4015	P22HT102/3 TaqI aus SmaI-B (-)	pUC19
pGM4016	P22HT102/3 TaqI aus SmaI-B (+)	pUC19
pGM4017	P22HT17/1 TaqI aus SmaI-B (-)	pUC19
pGM4018	P22HT17/1 TaqI aus SmaI-B (+)	pUC19

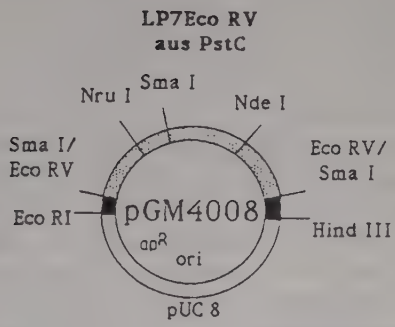
Fig. 2 Übersicht über neukombinierte pGM-Plasmide

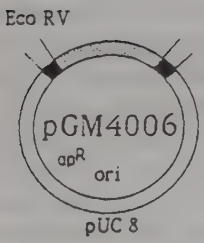



Eco RI
Pst I
cmR
tcR
pGM4013
ori
LP7-B
pBR 325
Pst I

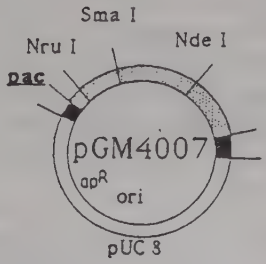

Eco RI
cmR
tcR
pGM4012
Pst I
ori
LP7-J
pBR 325
Pst I


Eco RI
cmR
tcR
Pst I
pGM4005
Eco RV
ori
LP7-C
pBR 325
Eco RV
Pst I


LP7Eco RV
aus PstC
Nru I
Sma I
Nde I
Sma I/
Eco RV
Eco RV/
Sma I
Eco RI
pGM4008
Hind III
apR
ori
pUC 8


LP7Eco RV
(links)
Eco RV
pGM4006
apR
ori
pUC 8

LP7Eco RV
(Mitte)
pac
pGM4014
apR
ori
pUC 19


LP7Eco RV
(rechts)
Sma I
Nru I
Nde I
pac
pGM4007
apR
ori
pUC 8

5. METHODEN

5.1 Biologische Methoden

5.1.1 Übernachtkulturen / Bestimmung von Phagentitern

Übernachtkulturen (ÜK) und Titerbestimmungen von Phagen wurden nach den üblichen Verfahren (für S.typhimurium und E.coli : Schanda-Mulfinger, 1979; für M13-Phagen: Messing, 1983) gemacht.

5.1.2 Vermehren und Konzentrieren von Phagen

5.1.2.1 Phagen von Salmonella typhimurium

Phagenlysate werden als Schüttelkulturen in LB oder NB hergestellt. Bei Klarplaquephagen kann eine hohe Infektionsmultiplizität gewählt werden (m.o.i. > 5); dadurch werden in einem Vermehrungszyklus des Phagen nahezu alle Zellen lysiert. Bei Trübplaquephagen wird eine kleinere Infektionsmultiplizität gewählt (m.o.i. = 0.1), um die Wahrscheinlichkeit einer Lysogenisierung möglichst gering zu halten. Die Inkubation erfolgt bei 34°C bis zum Aufklaren der Kultur durch vollständige Lyse der Bakterien, höchstens jedoch für 90 - 120 min. Nach dem Zusetzen einiger Tropfen Chloroform und Zentrifugation der Bakterienrückstände (15 min, 8 000 rpm, Sorvall-Rotor GS3) erhält man als klaren Überstand das Phagenrohlysat. Die derart gewonnenen Phagen müssen in aller Regel (z.B. vor einer Extraktion der DNA) weiter gereinigt und konzentriert werden.

Eine Methode ist das Pelletieren (Lysate bis 200 mL). Das Phagenrohlysat wird 150 min bei 26 000 rpm im Rotor SW27.1 (Beckman) ultrazentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig in 1 mL Lambda-Puffer suspendiert (5°C).

Größere Lysate werden über eine ECTEOLA-Säule (Austauscher-Cellulose CellexE, Biorad) konzentriert. Bei Bedarf werden konzentrierte Phagenlysate in einem CsCl-Blockgradienten weiter gereinigt und konzentriert (Kontron-Rotor TST28; 23 000 rpm; 90 min; 5°C).

5.1.2.2 Vermehrung von M13mp-Phagen

Im Gegensatz zu Lambda oder P22 lysiert der einzelsträngige Phage M13 seine Wirtszellen (JM101, JM105, JM109) nicht, sondern schleust reife Phagenpartikel aus den Zellen, während in den

Zellen die replikative Zwischenform des Genoms (RF) verbleibt. Je nachdem kann man zur Präparation von Templates (siehe 5.2.11) den phagenhaltigen Überstand oder zur Klonierung (siehe 5.2.5) das RF-haltige Pellet gewinnen.
Zur Vermehrung von M13 wird 1 L LB-Medium mit einer Vorkultur von JM101 oder JM109 (1 - 2 mL) und 0.1 mL eines Lysates von M13 bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Bakteriensuspension wird zentrifugiert (15 min, 9 000 rpm, Sorvall-Rotor GS3), wonach sich die Phagen im klaren Überstand befinden.
Bei Titerbestimmungen macht man sich zunutze, daß die E.coli Stämme JM101 - JM109 mit M13mp Phagen zur Alpha-Komplementation des lac Phänotyps fähig sind. 0.1 mL einer geeignet hohen Phagenverdünnung (10^{-9} - 10^{-10}) werden mit 10 uL IPTG (100 mM), 50 uL X-Gal (2 % in DMF), 0.1 mL frisch gewachsenem JM101 und 3 mL LB-Weichagar auf einer LB-Platte verteilt und für mindestens vier Stunden bei 37°C bebrütet. "Plaques" sind blau (wt) gefärbte Aufhellungen im Bakterienrasen, da durch die Phagenvermehrung das Wachstum der betroffenen Zellen verzögert wird.

5.1.3 Transduktionen

5.1.3.1 Transduktion bakterieller Marker

Um mit verschiedenen Salmonella-Phagen ohne Rücksicht darauf, ob man Klarplaquephagen (also solche, die unfähig sind, eine Bakterienzelle zu lysogenisieren) oder Trübplaquephagen in dem Experiment einsetzt, vergleichbare und reproduzierbare Transduktionen ausführen zu können, muß die Lysis transduzierter Zellen durch intakte Phagen verhindert werden. Dazu werden generell lysogene Empfängerzellen verwendet, die gegen eine weitere Infektion von Phagen immun sind.
Im Transduktionsansatz werden 0.9 mL einer frischen ÜK des Empfängerstammes mit 0.1 mL filtersterilisiertem Phagenlysat (m.o.i. < 10) gemischt. Bis zu dieser m.o.i. ist die Zahl transduzierter Zellen direkt proportional zur Phagenkonzentration. Das Transduktionsgemisch wird für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend in Eis gekühlt. In LB-Medium wird davon eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Jeweils 0.1 mL von dem Gemisch und der Verdünnung werden auf M9-Platten verteilt. Nach zwei Tagen Inkubation (37°C) können die Kolonien transduzierter Zellen ausgezählt werden. Zur Kontrolle werden 0.1 mL des Empfängerstammes ohne Phagen auf eine M9-Platte verteilt.

5.1.3.2 erf Transduktion unter recA Bedingungen
Mit Plasmiden, welche daraufhin untersucht werden sollen, ob sie ein pac Signal enthalten, wird der Salmonella Stamm 4412 recA transformiert. Auf diesen plasmidhaltigen Bakterien wird ein Lysat (2 - 5 mL) von P22 erf c2 gezogen. Unter diesen Bedingungen ist sowohl die bakterielle (recA abhängige) wie die phagenspezifische (erf) Rekombination ausgeschaltet. Diese Phagenlysate werden (filtersteril) zur Transduktion eingesetzt. Als Empfänger dient der Salmonella Stamm his ::H1. Der Transduktionsansatz folgt dem Protokoll der oben beschriebenen Transduktion, es werden jedoch 0.1 mL ÜK von his ::H1 mit 0.25 mL des Phagenlysates inkubiert. Nach 10 min wird das Gemisch 1:10 verdünnt und jeweils 0.1 mL aus dem Gemisch und der Verdünnung mit 2 mL LB-Weichagar auf Membranfilter (Schleicher&Schüll BA85 oder ME25/31) verteilt, die für 90 min auf LB-Platten bei 37°C inkubiert werden. Zur Induktion der tc-Resistenz wurden bei entsprechenden Transduktionen 100 uL autoklaviertes Chlortetracyclin (10 mg/mL) dem Ansatz hinzugefügt (Bochner et al., 1980). Danach werden die Filter auf LB-Platten, die ein selektives Antibiotikum enthalten, umgesetzt und für mindestens 24 h weiterbebrütet.

5.2 Biochemische Methoden

5.2.1 Isolierung von Phagen-DNA

Die Gewinnung durch mehrmalige Phenolextraktion und Bestimmung der Menge und Reinheit von Phagen-DNA mittels eines UV-Spektralphotometers (Beckman) erfolgte nach den beschriebenen Verfahren (z.B. Thomas und Abelson, 1966).

5.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

5.2.2.1 Alkalische Lyse von Bakterien (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)
Aus einer Einzelkolonie wird in 2 - 5 mL LB-Medium mit dem selektiven Antibiotikum eine ÜK gezogen, wovon 1.5 mL in einem Eppendorf-Gefäß pelletiert werden (1 min, 10 000 rpm). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 uL Lösung "A" (25 mM TRIS-HCl pH 8.0, 50 mM Sucrose, 10 mM EDTA) suspendiert (5 min, RT). Die Suspension wird mit 200 uL Lösung "B" (0.2 N NaOH, 1 %

SDS) gemischt, sofort mit 150 uL eiskalter Lösung C (3 M NaAc pH 4.8) versetzt, bis ein unlöslicher DNA-RNA-Proteinkomplex ausfällt, und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 000 rpm, 5 min, RT) wird der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 2 Vol EtOH gefällt (15 min, RT). Nach Zentrifugation (3 min, 10 000 rpm) und dem Waschen des Pellets mit 80 % EtOH/Wasser wird das vakuumgetrocknete Pellet in 45 uL Quarzwasser und 5 uL RNAase Lösung (5 mg/mL) gelöst. 5 uL dieser DNA-Lösung genügen normalerweise für Restriktionsanalysen oder die Transformation von Bakterien.

5.2.2.2 Präparation von Plasmiden für Klonierung, Sequenzierung und "nick Translationen" ("cleared lysate Methode" nach Clewell und Helinski, 1969)

Generell ist die Ausbeute an Plasmid-DNA aus Stämmen von E.coli besser als aus Stämmen von S.typhimurium . Dagegen macht es keinen Unterschied hinsichtlich der Reinheit und Ausbeute des präparierten Plasmids, ob die Kultur in M9 Casaminoacid-Medium oder in LB-Medium vermehrt wird.

Der plasmidtragende Stamm wird in 500 mL Kulturmedium (mit einem selektiven Antibiotikum) bei 37 ^{o}C geschüttelt bis zu einer Zelldichte von 4 - 5 x 10^{8} Zellen/mL. Eine Amplifikation des Plasmids erfolgt durch Zugabe von 200 ug/mL Chloramphenicol (bzw. Spectinomycin bei einem Plasmid mit einer Resistenz für Chloramphenicol). Anschließend wird für mindestens sechs Stunden weitergeschüttelt. Die Zellen werden vor dem Aufschluß pelletiert (15 min, 7 000 rpm, Sorvall-Rotor GS3). Das Pellet wird in 2.5 mL TRIS-Sucrose (10 mM TRIS-HCl pH 8.0, 25 % Sucrose) resuspendiert und mit 0.45 mL Lysozym (5 mg/mL) für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird nach Zugabe von 0.9 mL TRIS-EDTA (250 mM TRIS-HCl pH 8.0, 250 mM EDTA) für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 3.6 mL M-STET Puffer (50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 5 % Triton X100, 0.5 % Sucrose) wird die Suspension vorsichtig gemischt und 60 min bei 18 000 rpm zentrifugiert (Sorvall-Rotor SS34). Der klare Überstand wird auf eine Endkonzentration von 300 ug/mL EB eingestellt. In diesem Gemisch werden 0.903 g/mL CsCl gelöst. Die Ultrazentrifugation erfolgt für 48 h bei 38 000 rpm (5 ^{o}C, Kontron-Rotor TFT65). Die Plasmidbande wird mit UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einer Plastikspritze geerntet. Nach wiederholtem Ausschütteln des EB

mit dem gleichen Vol Butanol wird das CsCl durch Dialyse gegen TE-Puffer entfernt und die Plasmid-DNA mit Ethanol präzipitiert. Anschließend wird die DNA in Quarzwasser gelöst und die Ausbeute im UV-Spektralphotometer ermittelt.

5.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme vom Typ II spalten DNA an definierten, enzymspezifischen Erkennungsstellen. Jedes Restriktionsenzym besitzt individuelle optimale Reaktionsbedingungen, wobei die Hauptvariablen die Inkubationstemperatur und das Puffermilieu sind. Aus Gründen der Arbeitsökonomie hat sich allerdings die Beschränkung auf drei Puffer für die gängigen Enzyme bewährt: "high salt" für Enzyme, die bei hoher Ionenstärke, "medium salt" für Enzyme, die in einem mittleren Ionenmilieu und "low salt" für Enzyme, die bei geringer Ionenstärke arbeiten.
Die Zusammensetzung der Puffer ist dem Manual von Maniatis et al. (Cold Spring Harbor, 1982) entnommen.

Puffer	NaCl	TRIS-HCl (pH 7.5)	$MgCl_2$	DTT
"low"	0 mM	10 mM	10 mM	1 mM
"medium"	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
"high"	100 mM	50 mM	10 mM	1 mM

Inkubation mit Restriktionsenzymen
Ein typischer Spaltungsansatz enthält 0.2 - 2 ug DNA in einem Volumen von 10 uL. Dazu werden steriles dH_2O mit der DNA-Lösung in einem sterilen Eppendorfgefäß gemischt (9 uL), 1 uL des geeigneten 10x Reaktionspuffers dazugemischt und 1 - 2 U des Restriktionsenzyms dazugegeben. Die Inkubation erfolgt bei geeigneter Temperatur für 90 min. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 1.5 uL Farbmarker-EDTA-Mix gestoppt.

5.2.4 Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente, wie sie durch die Spaltung mit Restriktionsenzymen auftreten, trennen und eventuell reinigen zu können, ist die wichtigste Standardmethode die Gelelektrophorese. Im wesentlichen bestimmen vier Parameter die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA in Agarose- oder PAA-Gelen:
a. die Konformation der DNA: "supercoiled" DNA, "open circle" DNA und lineare DNA gleichen Molekulargewichts haben im Gel unter-

schiedliche Beweglichkeit.
b. die molekulare Größe der DNA: lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle wandern im Gel mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zu $\log_{10}$ ihres MW ist.
c. der elektrophoretische Stromfluß: bis etwa 5 V/cm ist die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA proportional zur Spannung.
d. die Konzentration des Trägermaterials: man kann durch die Wahl der geeigneten Gelkonzentration einen weiten Bereich verschieden großer DNA-Fragmente auftrennen.
Agarose: 0.3 - 2 %: Trennbereich 60 - 0.1 kb
PAA: 5 - 20 %: Trennbereich 1 000 - 10 bp

5.2.4.1 Agarosegelelektrophorese
Im allgemeinen werden horizontale Agarosegele mit 0.7 - 2.0 % Agarose verwendet. Der Gellauf wird so lange bei 75 V durchgeführt, bis das Bromphenolblau des Farbmarkers etwa zwei Drittel des Gels durchwandert hat. Im allgemeinen wird als Größenreferenz mit EcoRI gespaltene P22-DNA oder mit HindIII gespaltene Lambda-DNA (für DNA-Fragmente über 1 000 bp) oder mit EcoRI/HinfI gespaltende pBR322-DNA (für Fragmente unter 1 000 bp) eingesetzt. Die Größen der Eichfragmente sind:

P22: EcoRI		Lambda: HindIII		pBR322: EcoRI/HinfI	
A	19950 bp	A	23130 bp	A	1000 bp
B	9390 bp	B	9416 bp	B	633 bp
C	7340 bp	C	6557 bp	C1	515 bp
D	4080 bp	D	2322 bp	C2	505 bp
E	2450 bp	E	2027 bp	D	395 bp
F	1150 bp	F	564 bp	E	343 bp
G	1100 bp	G	125 bp	F	297 bp
H	860 bp			G1	220 bp
				G2	219 bp
				H	153 bp
				I	74 bp

5.2.4.2 Sichtbarmachen von DNA-Bruchstücken
Nach der Elektrophorese wird das Gel auf eine Kobalt-Quarzglasplatte gelegt und von unten mit UV-Licht (302 nm) durchstrahlt, so daß das in den DNA-Banden interkalierte EB durch eine orange Fluoreszenz (510 nm) sichtbar wird. Zur Dokumentation wird das Gel photographiert (Agfapan 100 oder Polaroid 667).

5.2.4.3 Polyacrylamidgele (nach Jeppesen, 1974)
In dieser Arbeit werden drei Arten von vertikalen PAA-Plattengelen verwendet:

5.2.4.3.1 native PAA Gele
Für die Präparation der Gele wird eine 40 % (w/v) Acrylamidstammlösung hergestellt. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid beträgt 30:1 (w/w). Die Stammlösung wird mit Amberlite MB-1 (4 % w/v, Serva) deionisiert und anschließend filtriert.
Zum Sichtbarmachen der Fragmente wird das Gel für 10 min in ein Färbebad mit EB (10 ug/mL) gelegt und danach bei UV-Licht betrachtet (siehe oben). Radioaktive Banden werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Röntgenfilm: Kodak XAR5 oder DuPont Cronex).

5.2.4.3.2 Proteingele
wurden nach dem Standardprotokoll von Laemmli (1970) hergestellt, nach dem Gellauf mit Coomassie-Blau angefärbt und danach in einem Vakuumtrockner auf Filterpapier (Whatman MM) getrocknet.

5.2.4.3.3 Denaturierende PAA-Harnstoffgele (modifiziert nach Maxam und Gilbert, 1980; Garoff und Ansorge, 1981)
werden zur Auftrennung der Proben von Sequenzierungsreaktionen (7.12.2) benutzt. Um die Proben in denaturiertem Zustand zu halten, werden die Gele mit 7 M Harnstoff und bei 50°C thermostatisiert gefahren. In dieser Arbeit werden vorwiegend Gelkonzentration von 6 % PAA verwendet. Die Gele werden als "Keilgele" (Dicke am oberen Gelende: 0.3 mm, unten 0.6 mm) hergestellt, so daß der Abstand der Banden über einen weiten Bereich des Geles annähernd konstant bleibt.

5.2.4.4 Bestimmung der Fragmentgrößen
Durch Ausmessen der Entfernungen der Banden vom Ursprung werden die Wanderungsstrecken der DNA-Bruchstücke bestimmt. Mit einem Computerprogramm von J. Messing und S. Mestad ("FANAL") können die Fragmente relativ zu den Größen bekannter Fragmente ausgerechnet werden.

5.2.4.5 Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Gelen
Die Rückgewinnung von DNA aus einer Gelmatrix erfolgt durch Elektroelution in Dialyseschläuchen bei 100 V. Zur Entfernung von Agarose- bzw. PAA-Verunreinigungen wird eine Phenolextraktion mit anschließender EtOH-Präzipitation durchgeführt.

5.2.5 Ligierung von DNA-Fragmenten
Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in entsprechend vorbereitete Vektoren wird hochgereinigtes Material eingesetzt. Die Ligation erfolgt im jeweils optimalen Mischungsverhältnis (Winnacker, 1984) für 16 h bei 12 - 18 ^{o}C. Bei überhängenden Enden wird 0.1 - 1 U, bei stumpfen Enden 1 - 5 U T4 DNA-Ligase eingesetzt. Der Reaktionsansatz folgt der von Maniatis et al. (1982) beschriebenen Prozedur.

5.2.6 Transformation von Bakterien
5.2.6.1 Transformation mit Plasmiden
Ein zu transformierender Bakterienstamm wird in einem Erlenmeyerkolben bis zur O.D.(580 nm) 0.4 (= log-Phase) geschüttelt. Jeweils 1.5 mL der Kultur werden pro Transformationsansatz in einem Eppendorf-Gefäß pelletiert (2 min, 10 000 rpm, RT) und in 1 mL eiskaltem NaCl (10 mM) zum "Waschen" resuspendiert. Nach erneutem Pelletieren werden die Zellen in 1 mL eiskaltem $CaCl_2$ (100 mM) resuspendiert und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Während dieser Phase werden die Bakterien kompetent für die Aufnahme von DNA (Cohen et al. 1972; Lederberg und Cohen, 1974). Die Zellen werden abermals pelletiert und in 0.2 mL kaltem $CaCl_2$ (100 mM) resuspendiert. Dazu werden 0.1 - 5 ug Plasmid-DNA pipettiert. Nach Inkubation (35 - 45 min auf Eis) wird der Ansatz 2 min einem "Hitzeschock" (42 ^{o}C) ausgesetzt und anschließend zur Regeneration mit 1 mL LB-Medium in einem Reagenzglas 90 min im Brutschrank geschüttelt. 0.1 - 0.2 mL davon werden auf einer selektiven LB-Platte verteilt. Bei pUC-Plasmiden und JM83 als Empfänger wird als Indikator zusätzlich 40 uL X-Gal (2%) auf der Agarplatte verteilt.

5.2.6.2 Transformation mit M13-Phagen
Grundsätzlich folgt man hierbei dem obigen Protokoll mit folgenden Änderungen: als Empfängerstämme für M13-Phagen werden JM101, JM105 oder JM109 verwendet und bereits bei einer O.D. von 0.3

kompetent gemacht. Die eingesetzte $CaCl_2$-Lösung ist 50 mM. Das Plattieren erfolgt ohne Regenerationsphase auf nicht-selektiven LB-Platten mit 4 mL LB-Weichagar, 15 uL IPTG (100 mM), 50 uL X-Gal (2%), 100 uL frischen Zellen von JM101 und 55 uL des Transformationsansatzes.

5.2.7 Nick-Translation (Maniatis et al., 1982)
Für eine Nick-Translation wird folgender Ansatz hergestellt:

zu markierende DNA	0.25 - 1 ug
10x Nicktranslationspuffer	5 uL
dCTP, dGTP, dTTP (250 uM)	je 1.5 uL
^{32}P dATP	10 uCi
DNA Polymerase I	1 U
dH_2O	ad 50 uL

und 2 h bei 18°C inkubiert.
Die Reaktion wird mit 5 uL EDTA (0.5 M, pH 8) gestoppt und das Enzym 10 min bei 60°C inaktiviert. Zur Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wird die markierte DNA mit 25 uL AmAc (7.5 M) und 105 uL Isopropanol bei -20°C für 30 min gefällt. Nach 10 min Zentrifugation wird das Pellet mit 80 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 uL TE gelöst.

5.2.8 DNA-DNA Hybridisierungsmethoden
Zur raschen Identifizierung von M13-Klonen werden 2.5 ug Template-DNA auf ein Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schuell BA85) aufgetragen und 1 h bei 60°C gebacken. Zur Prähybridisierung wird das Filter 1 h bei 60°C in 200 mL "Prähybridisierungslösung" (0.25 % Magermilchpulver in 6x SSC; Johnson et al., 1984) vorsichtig geschüttelt. Nach den Beobachtungen von Meinkoth und Wahl (1984) genügen sehr viel geringere Zeiten für das "Backen" und die Prähybridisierung der Filter als die z.B. bei Maniatis et al. (1982) angegebenen. Die Hybridisierung erfolgt 16 h bei 60°C mit einer geeigneten nick-translatierten DNA-Probe (5.2.7). Anschließend wird das Filter zweimal je 30 min in 100 mL "Waschlösung I" (2x SSC, 0.1 % SDS, 0.25 % Magermilchpulver; RT), danach zweimal je 30 min in 100 mL "Waschlösung II" (0.1x SSC, 0.1 % SDS; 55°C) langsam geschüttelt und nach dem Trocknen autoradiographiert.
Doppelsträngige DNA-Fragmente, die auf Agarosegelen aufgetrennt sind, werden nach der Methode von Southern et al. (1975;

modifiziert in: Maniatis et al. 1982) denaturiert und auf ein Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schuell BA85) "geblottet". Die Hybridisierung erfolgt wie oben.

5.2.9 Erzeugung von M13-Klonen zur Sequenzierung durch progressive Deletionen mit Exonuklease III (Yanisch-Perron et al., 1985; vergl. 7.4.1)

RF DNA (2 ug) von M13mp18W- oder M13mp19W-Klonen wird mit jeweils 10 U PstI und BamHI 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 0.12 Vol EDTA (80 mM), 0.4 Vol AmAc (5 M) und 2 Vol Isopropanol gefällt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde die DNA pelletiert (9 000 x g, 10 min). Das Pellet wurde mit kaltem 80 % EtOH sorgfältig gewaschen, im Vakuum getrocknet und danach in 40 uL ExoIII-Puffer (50 mM TRIS-HCl pH 8, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) gelöst. Dazu wurden 8 U Exonuklease III pipettiert und das Gemisch für 20 min bei 37°C inkubiert, wobei Aliquote von je 2 uL in Intervallen von 1 min in ein Eppendorf-Gefäß (auf Eis) überführt wurden, in dem sich zum Beenden der Reaktion 2 uL 10x ExoVII-Puffer (500 mM K-Phosphat pH 7, 80 mM EDTA, 10 mM DTT) befanden. Jeweils zwei Gefäße, in dem die Aliquote von zwei 10 min-Perioden gesammelt waren, wurden auf diese Weise erzeugt. Pro "Pool" wurden nun 0.1 U Exonuklease VII hinzupipettiert und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C (15 min) beendet. Als nächstes wurden 1.5 uL $MgCl_2$ (200 mM), 0.5 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und 1 uL einer Lösung von dATP, dCTP, dGTP und dTTP (jeweils 8 mM) hinzugefügt und 30 min inkubiert (RT). 5 uL davon (entsprechend 200 ng DNA) wurden mit 5 uL 10x Ligationspuffer (250 mM TRIS-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 25 mM Hexaminkobalt(III)chlorid und 5 mM Spermidin) versetzt. Dazu wurden 2 U T4 DNA-Ligase pipettiert und das Reaktionsvolumen mit dH_2O auf 50 uL eingestellt. Nach einer dreistündigen Inkubation (RT) wurde die DNA wie oben beschrieben präzipitiert. Das Pellet wurde in 40 uL TE gelöst. Davon wurden 10 uL für die Transformation von JM105 oder JM109 eingesetzt.

Anmerkung: Da die Präparationen von Exonuklease III und VII etwas variieren, muß die optimale Enzymkonzentration in einem Vorversuch ermittelt werden.

5.2.10 DIGE (Messing, 1983)

Eine elegante und rasche Methode, M13-Klone, die durch progres sive Deletionen erzeugt worden sind, hinsichtlich ihrer Größe sortieren, ist die "direkte Gelelektrophorese" (DIGE). Deutlic Ergebnisse liefert diese Methode allerdings erst ab einer Größ der inserierten Fragmente von mehr als 200 bp. 20 uL eines M13-Lysates werden mit 1 uL SDS (2 %) und 3 uL Farbmarker gut gemischt und auf einem Agarosegel (0.7 %) elektrophoretisch getrennt. Als Größenstandard werden M13mp18 und M13-Phagen mit bekannter Insertgröße eingesetzt. Die elektrophoretische Beweg lichkeit der ssDNA aus rekombinanten M13-Phagen sinkt proportional mit der Länge der inserierten DNA. Außerdem erhält man näherungsweise eine Auskunft über die Menge an produzierter ssDNA, was für die Templatepräparation (5.2.11.1) wichtig ist.

5.2.11 DNA-Präparation zur Sequenzierung

5.2.11.1 Präparation von Template-DNA zur M13-Sequenzierung

11 mL LB-Medium werden (100 mL Erlenmeyerkolben) mit 100 uL ei Vorkultur von JM109 (O.D. 0.2 bei 580 nm) und 50 uL M13-Phagenlysat (d.h. M13-Phagen, die das zu sequenzierende DNA-Fragment enthalten) infiziert und für mindestens 7 h bei 37°C geschüttelt. Die Kulturen werden zentrifugiert, um einen klare Überstand zu gewinnen (15 min, 12 000 rpm, 4°C, Sorvall-Rotor SS34). 1 mL dieses Überstandes wird zur direkten Phagenanalyse (siehe 5.2.10) abgezweigt; das übrige Lysat wird zur Templatepräparation verwendet. Zum Fällen der Phagen werden 9 mL des Lysates in einem Corex-Zentrifugenglas mit 0.5 mL NaAc (5 M) u 0.5 mL 40 % PEG 8 000 (Sigma) gut gemischt und 45 - 60 min auf Eis inkubiert. Um diesen Prozeß zu optimieren, wird die Mischu zentrifugiert (15 min, 9 000 rpm, 4°C, Sorvall-Rotor SS34) und der Überstand möglichst quantitativ entfernt. Das Phagenpellet wird in 200 uL TRIS-EDTA (10 mM TRIS-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA) resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Durc zweimalige Phenolextraktion werden die Proteine und das PEG vo der DNA entfernt. Die wässerige Phase wird mit 0.1 Vol NaAc (3 pH 7.0) und 2 Vol EtOH versetzt (3 h, -20°C). Die nach der Zentrifugation pelletierte DNA wird gewaschen (80% EtOH) und n dem Trocknen in 40 uL TRIS-HCl (20 mM, pH 7.5) gelöst. Die DNA-Menge wird im UV-Spektralphotometer bestimmt.

5.2.11.2 Präparation von Plasmid-DNA zur Sequenzierung
Anstelle von einzelsträngiger M13-DNA kann auch doppelsträngige Plasmid-DNA zur Sequenzierung eingesetzt werden. Die Präparation erfogt im wesentlichen der alkalischen Lyse-Methode (5.2.2.1) mit folgenden Änderungen: Die Lösung "A" enthält zusätzlich Lysozym (5 mg/mL). Nachdem der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt ist, wird mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) phenolisiert und die obere Phase mit 2 Vol EtOH gefällt. Das getrocknete Pellet wird in 100 uL TE-Puffer gelöst und mit 2 uL RNase (5 mg/mL) 15 min inkubiert (RT). Anschließend wird die DNA ein weiteres Mal phenolisiert, mit Chloroform extrahiert und mit EtOH gefällt. Durch das zweimalige Phenolisieren erhält man Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung genügend rein ist.

5.2.12 Sequenzierung von DNA

5.2.12.1 DNA-Sequenzierung nach Sanger (1977, 1980)

5.2.12.1.1 Annealing (ssDNA)

Der Annealing-Ansatz wird in eine 100 uL-Glaskapillare (Brand) eingeschmolzen und in einem Wasserbad auf 80°C erhitzt.
Danach wird das Wasserbad abgeschaltet und die Kapillaren langsam auf RT abgekühlt.

Annealing-Ansatz: 5 uL ssDNA in TE (ca. 0.3 ug)
1 uL 10x Annealing-Puffer (TRIS-HCl 100 mM pH 8, $MgCl_2$ 100 mM, NaCl 500 mM)
1 uL Primer (2.5 ug/mL)
5.5 uL dH_2O

5.2.12.1.2 Denaturierung und Annealing von dsDNA

2 - 3 ug Plasmid-DNA werden getrocknet, in 40 uL Denaturierungspuffer (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA pH 8.0) gelöst und 5 min inkubiert (RT). Zum Neutralisieren werden 4 uL AmAc (2M, pH 4.5) dazugegeben und die DNA sofort mit 2 Vol EtOH (-20°C) gefällt (5 min, -70°C).
Die denaturierte Plasmid-DNA wird zur Annealing-Reaktion in folgendem Ansatz gelöst (der Primer ist derselbe wie für die M13-Sequenzierung, wenn man Fragmente sequenziert, die im Polylinker von pUC-Plasmiden inseriert sind):

2 uL Primer (2.5 ug/mL)
1.5 uL 10 x Annealing-Puffer (70 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 70 mM $MgCl_2$, 300 mM NaCl, 100 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8.0)
2 uL ^{35}S dATP (8 uCi/uL)
9.5 uL H_2O

Dieser Ansatz wird 15 min bei 37°C inkubiert.

5.2.12.2.1 Sequenzreaktionen (M13-DNA)

Das Annealing-Gemisch wird aus der Kapillare in ein Eppendorf-Gefäß überführt und davon je 2 uL in 4 deckellose Eppendorf-Gefäße verteilt und kurz abzentrifugiert. An den obere Rand der Gefäße setzt man je 2 uL der einzelnen Nukleotidgemisch und daneben je 2 uL der Polymeraselösung (pro Annealing-Reaktion: 1 - 1.5 U Klenow Polymerase, 4 uCi ^{32}P oder ^{35}S dATP ad 8 uL mit TRIS-HCl (10 mM, pH 8). Durch kurzes Zentrifugieren wird die Reaktion gestartet und 15 min bei 42°C inkubiert. Danach pipettiert man in jedes Gefäß jeweils 2 uL Chase-Mix, zentrifugiert kurz und inkubiert 15 min bei RT. Die Reaktion wird durch Hinzufügen von 4 uL Farbmarker gestoppt. Zur Denaturierung der DNA kocht man die Gemische 3 min, stellt sie dann sofort auf Eis und trägt ca. 2 uL von jeder Reaktion au das Gel auf.

a) Nukleotidmischungen

Nukleotide	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
	uM	uM	uM	uM
dTTP	93.75	135	135	40.5
dCTP	93.75	40.5	135	135
dGTP	93.75	135	135	135
ddGTP	-	-	750	-
ddCTP	-	750	-	-
ddATP	50	-	-	-
ddTTP	-	-	-	1500

b) Chase: jeweils 0.125 mM der vier dNTPs

Alle Lösungen werden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

5.2.12.2.2 Sequenzreaktionen (pUC-DNA; Chen und Seeburg, 1985)
a) Nukleotidmischungen

Nukleotide	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
	uM	uM	uM	uM
dTTP	100	100	100	5
dCTP	100	10	100	100
dGTP	100	100	5	100
ddGTP	-	-	120	-
ddCTP	-	100	-	-
ddATP	100	-	-	-
ddTTP	-	-	-	500
10x Annealing Puffer	20	20	20	20
H_2O	50	86	86	48

b) Chase: jeweils 0.125 mM der vier dNTPs

5.2.12.3 DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1977)
Die für die Sequenzierung notwendigen Prozeduren wie Markierung der Fragmentenden, Strangtrennung und Sequenzreaktionen wurden der Anleitung von Maxam und Gilbert (1980) entnommen.

6. Computerunterstützte DNA-Analyse
Die Zuordnung der nach der M13-Methode (Sanger et al., 1977; Messing, 1983) erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe eines von J. Messing erhaltenen Programmes "Sequence analysis version 3.0", basierend auf Version 2.1 von Larson und Messing (1983). Dieses Programm erleichterte auch das Auffinden der Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen und die Suche nach offenen Leserahmen von möglichen Proteinen innerhalb der gefundenen DNA-Sequenz. Außerdem führt das Programm Homologievergleiche von DNA- und Proteinsequenzen durch. Als Hardware dient ein Apple IIe Computer, der mit dem System UCSD Pascal betrieben wird.

7. E R G E B N I S S E

7.1 Allgemeine biologische Charakterisierung

Bei den Bakteriophagen, die in dieser Arbeit vergleichend untersucht werden, handelt es sich ausschließlich um solche, die Salmonella typhimurium als Wirt benutzen. Wie bereits in der Einführung bemerkt wurde, sind diese Phagen großenteils seit langer Zeit isoliert und mehr oder weniger grob beschrieben.

Nur P22 (und mit starken Einschränkungen L) stellten auch dann noch ein Forschungsobjekt dar, als neben die klassischen Methoden der Phagengenetik mehr biochemisch orientierte Techniken wie die Analyse von Proteinen und von DNA, rekombinante DNA-Techniken, in vitro Assemblierung und in vitro Verpackung und DNA-Sequenzierung traten. Nun wäre es in der Tat nicht sehr sinnvoll, alle an P22 unternommenen Experimente mit allen übrigen Phagen von S.typhimurium zu wiederholen, weil man vernünftigerweise nicht erwarten kann, dadurch sehr viele zusätzliche Erkenntnisse zu gewinnen.

Es gibt jedoch einige Fragestellungen, die ein solches Unternehmen, insbesondere wenn es vergleichend angelegt ist, als sinnvoll erscheinen lassen. Wie einleitend dargestellt wurde, handelt es sich dabei hauptsächlich um Fragen nach der Evolution dieser Phagengruppe einerseits und um die Suche nach Signalen auf der Phagen-DNA, die zum spezifischen Start der Verpackung notwendig sind anderseits. Das Hauptziel dieser Arbeit und entsprechend die Versuchsansätze sind eindeutig ausgerichtet auf die Suche und den Vergleich von Abschnitten auf der DNA von Phagen, die in irgendeiner Weise ein spezifisches Startsignal für die Verpackung von DNA in Phagenköpfe enthalten.

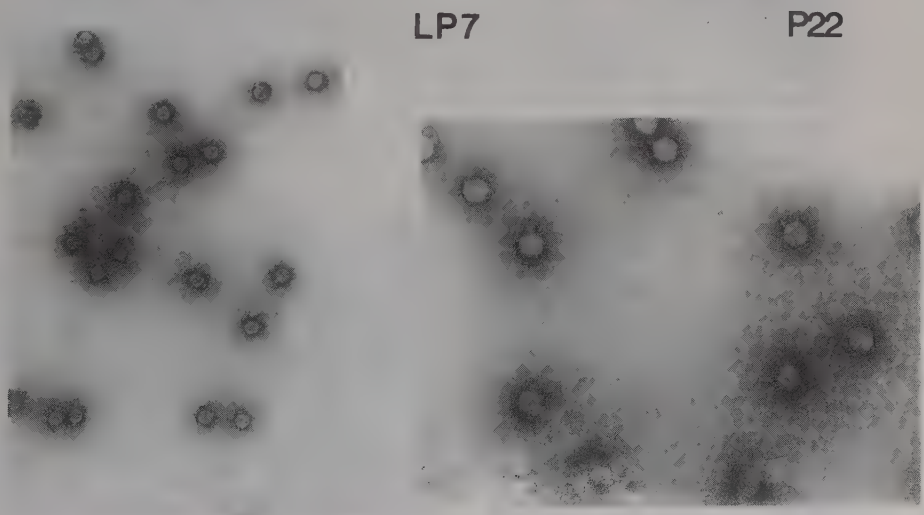
Es erscheint uns jedoch nicht unzweckmäßig zu sein, diesen z.T. stark ins Detail gehenden Untersuchungen zunächst Ergebnisse voranzustellen, welche eine mehr allgemeine und vergleichende biologische und biochemische Charakterisierung der betrachteten Bakteriophagen darstellen. Es handelt sich ja bei diesen Phagen - wie erwähnt - um sozusagen "exotische" Verwandte von P22, so daß wir keine allgemeinen Vorkenntnisse voraussetzen können.

7.1.1 Morphologie

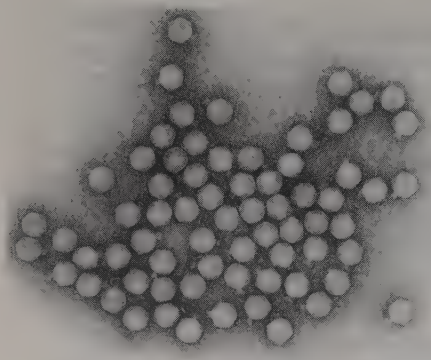
Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop (Fig.3) von Phagen, die über einen CsCl-Stufengradienten konzentriert und gereinigt wurden, lassen erkennen, daß die Phagen L, LP7, KB1, A1a, A2f und A3 demselben Baumuster wie P22 folgen: ein ikosaedrischer Kopf von etwa 60 nm Durchmesser (Anderson, 1961) enthält im reifen Phagen die DNA. Am Kopf befindet sich ein kurzer, dicker Schwanz (Länge ca. 6 nm), der die spezifische Anheftung an und die Führung der DNA bei deren Injektion in das Wirtsbakterium übernimmt. Die Bilder der einzelnen Phagen sind einander so ähnlich, daß man sie äußerlich nicht unterscheiden kann. Die einzige Ausnahme von diesem Bauplan stellt ES18h1 dar. Bereits Kuo und Stocker (1970) beobachteten, daß ES18h1 zwar ebenfalls einen ikosaedrischen Kopf von 60 nm Durchmesser besitzt, aber einen vergleichsweise langen Schwanz hat, der Ähnlichkeit mit demjenigen des Phagen Lambda aufweist. Yamamoto (zitiert bei Kuo und Stocker) vermutet, daß ES18h1 ein Rekombinationsprodukt von einem Phagen der Gruppe A mit einem aus der Gruppe B ist.

Genauere Berechnungen aufgrund der Elektronenmikroskopbilder ergeben, daß bei ES18h1 das Längenverhältnis von Kopf zum Schwanz sogar noch extremer als bei Lambda ist (Lambda 1:2.5; ES18h1 1:3.5).

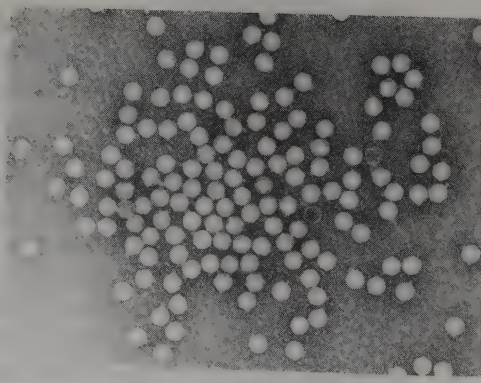
Fig.3. **Phagen von S.typhimurium** (Vergrößerung 150000 x)



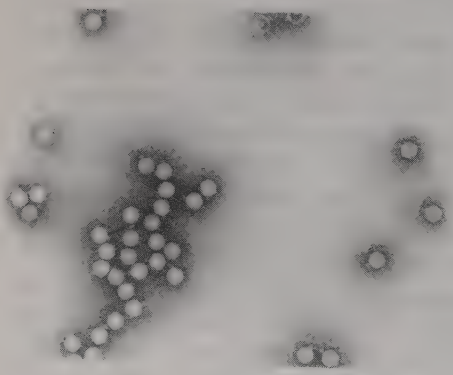
L



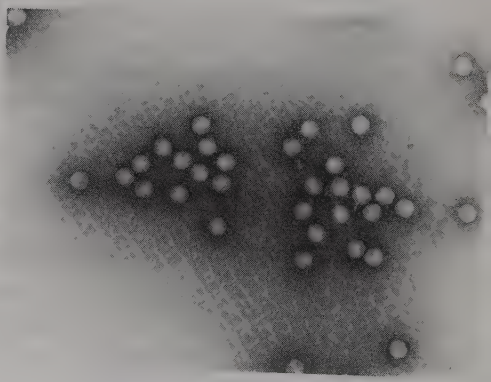
A1a



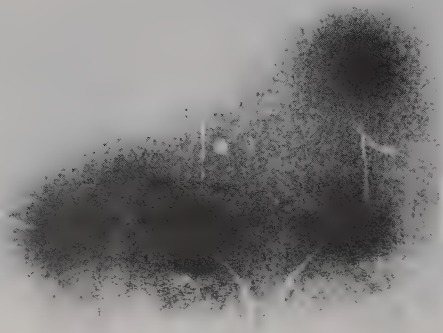
KB1



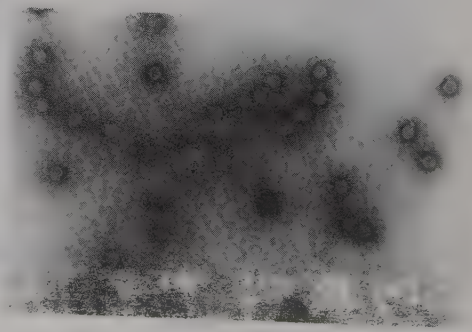
A2f



ES18



A3



7.1.2 Immunität

Eines der ursprünglichen Kriterien für einen "neuen" Phagen von S.typhimurium war bei den Erstbeschreibern jeweils, daß der Phage heteroimmun zu P22 war. Auch bei der frühen Klassifizierung der Phagen der Gruppe A von Boyd (1950) stellt neben der Plaqueform (die man heute wegen der schlechten Objektivierbarkeit und der medienchargen-abhängigen Reproduzierbarkeit als Kriterium nur mit Vorsicht benutzt) die Hitzeresistenz und die wechselseitige Immunität ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal dar. Um die wechselseitige Immunität aller acht Phagen vergleichen zu können, wurde jeweils der Salmonella Stamm DB21 mit den einzelnen Phagen lysogenisiert. Dazu wurde ein Tropfen eines Lysates des betreffenden Phagen auf einen Rasen von DB21 getropft. Nach der Bebrütung konnten innerhalb des Lysishofes immune Zellen isoliert werden, welche den jeweiligen Phagen als Prophagen enthielten. Mindestens von den Phagen P22, LP7, L und ES18h1 ist bekannt (Smith und Levine, 1965; Kitamura und Mise, 1970, Kuo und Stocker, 1970), daß sie in der gleichen Region des Wirtsgenomes, nämlich nahe dem Gen proA , ihren Integrationsort haben. Kein einziger dieser Phagen ist in der Lage, proAB Deletionsmutanten von S.typhimurium zu lysogenisieren. Für die anderen vier Phagen liegen keine Daten über deren Integrationsort vor. Es besteht aber kein Grund zu der Vermutung, daß sie einen anderen Integrationsort als P22 benutzen. Selbst wenn sie dies täten, hätte das auf die hier gestellten Fragen keinen Einfluß.

Die Kreuzimmunität wurde im folgenden Versuchsansatz getestet: es wurden jeweils unter vergleichbaren Bedingungen Lysate der einzelnen Phagen auf dem Stamm DB21 hergestellt. Davon wurden je 20 uL auf die mit den acht Phagen lysogenisierten DB21 (DB21::L, DB21::LP7 usw.) getropft und nach dem Bebrüten ausgewertet. Zusätzlich wurde der Test mit DB21 ohne Prophagen durchgeführt. Ein Aspekt, der in einer Versuchsreihe zur Kreuzimmunität in Betracht gezogen werden muß, ist das Verhalten der geprüften Phagen gegenüber den Systemen von P22, die zum Ausschluß überinfizierender Phagen führen (sieA und sieB , Rao, 1968; Susskind et al., 1971; Walsh und Meynell, 1976). Nur bei sieAB Mutanten von P22 kann man entscheiden, ob ein Phage homo- oder heteroimmun zu

P22 ist, während der Wildtyp (H1) ein Wachstum aller überinfizierenden Phagen verhindert.

Außerdem sollte der Versuch Aufschluß darüber geben, ob einer der Phagen über ein zu sie analoges System verfügt, was sich durch Nicht-Wachstum der Phagen auf dem betreffenden lysogenen Prophagen trotz nachgewiesener reziproker Heteroimmunität zeigen sollte. Das Ergebnis dieses Vergleiches ist in der Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1. **Kreuzimmunität aller acht untersuchten Phagen**
(c = klare Lysis; t = trübe Lysis; - = keine Lysis)

lysogener	Phagen							
Stamm	P22(H5)	LP7	L	KB1	ES18h1	A1a	A2f	A3
DB21	c	t	t	t	c	t	t	t
DB21::H1	-	-	-	-	-	-	-	-
DB21::P22sie	-	t	c	t	-	t	t	t
DB21::LP7	-	-	-	-	c	-	-	-
DB21::L	c	c	-	-	c	-	-	t
DB21::KB1	t	c	c	-	c	-	-	t
DB21::ES18h1	c	t	t	t	-	t	t	t
DB21::A1a	t	c	t	-	c	-	-	t
DB21::A2f	c	c	t	-	c	-	-	t
DB21::A3	c	c	t	-	c	-	-	-

Als besonders bemerkenswert sollen die folgenden Befunde herausgestellt werden:

1) Die nicht-reziproke Immunität von P22 und ES18h1 (Kuo und Stocker, 1970) konnte bestätigt werden. Mit "nicht-reziprok" ist gemeint, daß zwar P22 auf dem Stamm DB21::ES18h1 Plaques bildet, umgekehrt aber ES18h1 auf DB21::sie nicht wachsen kann. Da Kuo und Stocker jedoch noch keine Kenntnis von sie Systemen hatten, kann man sagen, daß die Erstautoren "Glück" hatten, weil sich ihre Behauptung erst im Nachhinein auch unter genetisch geklärten Bedingungen bestätigen ließ.
2) Die Heteroimmunität der übrigen Phagen zu P22 sieAB läßt sich bestätigen und alle Phagen werden von den sie Systemen von P22 ausgeschlossen.
3) Auf DB21::LP7 vermehrt sich nur der Phage ES18h1. Nur bei

P22 ist der Ausschluß heteroimmuner Phagen noch vollständiger. Daher liegt das Vorhandensein eines zu sie analogen Systems bei LP7 als Erklärung nahe (vergl. 7.3.2).

4) Außer von dem eigenen Prophagen werden die Phagen L und A3 nur von H1 und LP7 an der Vermehrung gehindert, H1 und LP7 schließen sich nur wechselseitig aus.

5) Die Phagen KB1, A1a und A2f sind nur zu P22 und ES18h1 heteroimmun. Für LP7 kann zu dieser Frage nichts ausgesagt werden, solange keine Mutanten verfügbar sind, die den P22 sie Mutanten entsprechen.

7.1.3 Transduktionsexperimente

Bei der Transduktion unterscheidet man üblicherweise in Abhängigkeit von den übertragbaren Chromosomenbereichen zwei Hauptkategorien: die spezielle und die generelle Transduktion. Bakteriophagen, die zur "speziellen Transduktion" in der Lage sind, "übertragen" nur wenige bestimmte bakterielle Genorte. Als klassisches Beispiel hierfür ist die Übertragung der gal Loci durch den Phagen Lambda von Escherichia coli zu nennen (Morse et al., 1956). Die ortsspezifische Rekombination des Phagengenomes mit dem Bakterienchromosom ist die Voraussetzung für die Entstehung solcher speziell transduzierender Partikel. Einige Phagengene werden durch bakterielle Gene ersetzt, die dem Ort der Prophagenintegration benachbart sind. In solch einem transduzierendem Partikel ist entsprechend nur noch ein Teil des Phagengenoms erhalten, weshalb in der Regel keine Plaques gebildet werden können.

In diesem Punkt sind jene transduzierenden Partikel den allgemein transduzierenden Partikel von P22 ähnlich, da auch diese defekt sind und eine Empfängerzelle nicht lysogenisieren können (Starlinger, 1958) oder Plaques bilden können. Im Unterschied zu den speziell transduzierenden Phagen können allgemein transduzierende Partikel jedoch prinzipiell alle Genorte des Bakterienchromosoms übertragen. In einem typischen Wildtyp-Lysat enthalten etwa 1-5 % aller Phagenpartikel bakterielle anstelle von Phagen-DNA (Schmieger, 1972; Ebel-Tsipis et al., 1972). Allerdings wurde bald beobachtet und später quantifiziert (Zinder, 1955; Ozeki,

1959; Schmieger, 1982), daß bestimmte Bereiche des Chromosoms von Salmonella unterschiedlich häufig in der DNA transduzierender Partikel enthalten sind. Beispielsweise wird das Gen hisHB22 von P22 relativ oft transduziert, wohingegen etwa das Gen argG nur etwa drei Zehnerpotenzen seltener übertragen wird (Schmieger, 1982). Hochtransduzierende (HT) oder niedrigtransduzierende (NT) Mutanten von P22 wie HT12/4 oder NT1/1 (Schmieger, 1972) unterscheiden sich vom Wildtyp sowohl in der absoluten Häufigkeit, mit der unter dem Phagenwurf transduzierende Partikel im Verhältnis zu den infektiösen Partikeln auftreten wie in der relativen Häufigkeit, mit der einzelne Marker übertragen werden. Insbesondere die Mutante HT12/4 unterscheidet bei weitem nicht mehr so sehr zwischen einzelnen Markern wie der Wildtyp und überträgt alle untersuchten Marker mit stark erhöhter, wenn auch nach wie vor etwas unterschiedlicher Frequenz (Schmieger und Backhaus, 1976; Chelala und Margolin, 1976).

Boro und Brenchley (1971) sowie Kitamura und Mise (1971) beobachteten, daß andere Phagen von Salmonella wie KB1 oder LP7 zwar ebenfalls allgemein transduzieren, aber einige untersuchte bakterielle Marker mit wesentlich anderen Frequenzen als P22 übertragen.

Damit in einem direkten Vergleich aller acht Phagen die verschiedenen Transduktionshäufigkeiten einander gegenüber gestellt werden konnten, wurden diese in einem Parallelexperiment ermittelt (vergl. 5.1.3). Auf dem Stamm DB21 (als Spender der bakteriellen DNA) wurden Phagenlysate mit vergleichbaren Titern hergestellt und damit die Transduktionen ausgeführt. Als Empfängerbakterien kamen Mutanten von S.typhimurium zum Einsatz, die zuvor mit P22::H1 oder P22::sieAB lysogenisiert worden waren, wodurch die Lysis der Empfängerkulturen durch infektiöse Partikel wenigstens teilweise ausgeschlossen war. Die Empfängerstämme wurden so ausgewählt, daß die in dem Experiment getesteten Mutationen über das gesamte Chromosom von Salmonella verstreut waren. Die Mutationen betrafen im einzelnen die folgenden Gene: leuC126 (bei 3' auf dem Chromosom von Salmonella), trp-8 (34'), hisHB22 (42'), cysC (60'), cysE (79') und argE72 (88'). In der folgenden Tab. 2 sind die ermittelten Transduktionshäufigkeiten als Transduktanten/Phagen (T/P)-Ver-

hältnisse angegeben. Diese Darstellungsweise bietet den Vorteil, Unterschiede im Phagentiter rechnerisch eliminieren zu können, so daß die Werte direkt vergleichbar werden. Der Vergleich der verschiedenen Häufigkeiten, mit der die einzelnen Phagen einen bestimmten bakteriellen Marker übertragen, zeigt deutliche Unterschiede in der Verteilung der Minima und Maxima. Mit dem gängigen Modell für die Entstehung transduzierender Partikel (Chelala und Margolin, 1974) läßt sich dieses Ergebnis - wie noch ausführlich zu diskutieren sein wird - gut erklären.

Tab. 2. **Transduktionswerte** (ausgedrückt als Verhältnis von Transduktanten zu Phagen "T/P") für ausgewählte bakterielle Marker bei verschiedenen Salmonella Phagen

	eingesetzte Phagen							
	P22	L	LP7	A1a	A2f	A3	KB1	ES18h1
Empfänger								
1003::H1 hisHB22	14	14	5.7	34	0.14	0.53	0.4	2.2
1023::H1 leuC	1.7	3.6	6	15	3.5	6	6	8
1061::H1 trp-8	4	3.1	1.5	7	6.4	0.53	4	0.6
1095::H1 arg	0.7	0.5	0.1	1.5	1.2	1.8	2.4	3.6
1104::sie cysC	13	4	0.9	97	120	0.8	7.4	4.2
1109::sie cysE	5.5	16	0.42	28	330	2	13	2.2

7.1.4 Versuche zum "marker rescue" verwandter Gene durch Mutanten von P22

Ein vergleichsweise einfacher und gleichzeitig sehr aussagekräftiger Versuchsansatz, mit dem die Verwandtschaft der Phagen L, KB1, A1a, A2f, A3 und ES18h1 zu P22 untersucht werden sollte, stellte das folgende Vorgehen dar, das auf auf dem "marker rescue" von defekten Genen von P22 beruht: auf dem Stamm DB21, der die oben genannten Phagen als Prophagen enthielt, wurden verschiedene amber-Phagen von P22 gestempelt. Wenn die amber-Mutante durch Rekombination das betroffene Gen gegen das entsprechende Gen des lysogenen Phagen so eintauscht, daß die neue Kombination funktionsfähig wird, kann sich die Mutante vermehren. Dies aber kann nur der Fall sein, wenn die betroffenen Gene bei beiden Phagen in analoger Weise funktionieren. Nach den Beobachtungen bei der Untersuchung der Kreuzimmunität war klar, daß dieses Experiment mit LP7 nicht durchgeführt werden konnte, da dieser prinzipiell das Wachstum aller übrigen Phagen ausschloß und mir keine Mutante von LP7 zur Verfügung stand, die dieses Ausschlußverhalten nicht zeigt. DB21:: sie wurde als Indikator in einem Kontrollexperiment eingesetzt, um zu überprüfen, ob alle verwendeten amber-Phagen P22-Immunität besitzen. Tatsächlich konnte sich auf DB21::H1 keiner der geprüften amber-Phagen vermehren.

Das Ergebnis der Versuchsreihe ist in der Tab. 3 wiedergegeben. Um das Ergebnis übersichtlicher darzustellen, wurden die verwendeten amber-Phagen in der Reihenfolge des Prophagengenoms (Smith und Levine, 1965) angeordnet. Dadurch fallen austauschbare Gene oder Gengruppen leichter auf. Als positive Kontrolle wurde der Test auch auf dem Suppressorstamm su70 durchgeführt, auf dem sich alle verwendeten amber-Mutanten vermehren können. Außerdem mußte der Tatsache Rechnung getragen werden, daß einige der amber-Phagen (am 24, 10, 20, 16, 9) "leaky" sind, d.h. daß sie sich mit einer gewissen Rate auch auf einem su$^-$-Stamm vermehren. Deshalb wurde der Versuch auch auf DB21 ohne Prophagen durchgeführt. Für alle Werte ist also entsprechend als Basiswert das Wachstum auf dem su$^-$-Stamm DB21 zu betrachten (und gewissermaßen vom ermittelten Wert bei den amber-Phagen zu

subtrahieren).

Der Versuch wurde in dem folgenden Ansatz durchgeführt: von Phagenverdünnungen (10^{-2}-10^{-5}) der verfügbaren P22 amber-Phagen wurden je 150 uL in Mikrotiterplatten pipettiert. Mit einem Zackenstempel wurde auf vorplattierte Rasen der verschiedenen, einen Prophagen tragenden DB21-Kulturen und der Kontrollstämme su70 und DB21 jeweils von allen amber-Phagen ein Tropfen übertragen. Nach Bebrüten über Nacht bei 37°C wurden die Kontaktareale untersucht.

Die Anordnung der amber-Phagen in der Reihenfolge des Prophagengenoms ließ rasch erkennen, ob Gruppen von Genen austauschbar sind oder aber nur einzelne, über das Genom verstreute Gene.

Die gefundenen Marker-rescue-Werte sind semiquantitativ angegeben. Die Menge an Plaques in den einzelnen Verdünnungsstufen war dabei entscheidend. Zeigte sich bereits bei der höchsten Verdünnungsstufe deutliche Lysis, wird der Wert als "++++" wiedergegeben. Gibt es dagegen selbst bei der niedrigsten Stufe keine Plaques, erhält der Phage den Wert "-". Die Übergänge zwischen den Extremen sind durch entsprechende Zwischenstufen dargestellt.

Tab. 3. **Marker rescue durch verschiedene P22 amber-Phagen**
(Der den Prophagen tragende Stamm ist stets DB21 und erscheint der Übersicht wegen nicht vor der Phagenbezeichnung.)

	(lysogene) Stämme							
	su70	DB21	::L	::A1a	::A2f	::A3	::ES18	::KB1
P22 amber-Phagen								
am 24	++++	+	++++	++++	++++	++++	++++	(+)
am 18	+++	(+)	++	++	+++	++	+++	-
am 12	++++	(+)	+++	++	+++	+++	+++	(+)
am 23	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+
am 13	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+
am 19	++++	(+)	+++	++	++	++	++++	+
am 3	++++	(+)	+++	+++	++	+++	-	(+)
am 2	++++	(+)	++++	++++	++++	++++	-	(+)
am 1	++++	(+)	++++	++++	++++	+++	-	-
am 8	++++	(+)	+++	++	++	++	(+)	-
am 5	+++	(+)	+++	++	+++	+++	-	-
am 10	++++	+	++++	++	++++	++	++	+
am 20	++++	+	++++	+++	+++	+++	+	+
am 16	++++	+	++++	+++	++++	++++	++	+
am 9	++++	+	++++	+++	++++	++++	++	(+)

Aus den Ergebnissen läßt sich erkennen, daß die Prophagen L, A1a, A2f und A3 allen geprüften P22-amber-Phagen zu Wachstum verhelfen. Auffällig anders verhält sich ES18h1 als Prophage, da nur Amber-Phagen mit einem Defekt in einem der frühen Gene 24, 18, 12, 23 und 13 wachsen, während keines der späten Gene, die hauptsächlich für strukturelle Komponenten des Phagenkopfes und -schwanzes kodieren, ersetzt werden kann. DB21::KB1 verhält sich nicht anders als die Kontrollreihe auf dem Stamm DB21 alleine, woraus geschlossen werden kann, daß zwischen P22 und KB1 allenfalls sehr geringe Gemeinsamkeiten bestehen, die nicht zu einem marker-rescue ausreichen. Dies ist angesichts der identischen Morphologie der Phagenpartikel von KB und P22 (vergl. Fig. 4a) sehr erstaunlich.

7.2 Allgemeine biochemische Charakterisierung

7.2.1 Proteinmuster

Aufgrund der elektronenmikroskopischen Bilder (Fig. 3) war nicht zu erwarten, daß die Proteinmuster der Phagenköpfe (mit Ausnahme von ES18h1) große Unterschiede aufweisen. Der Vollständigkeit halber wurden sie trotzdem geprüft.

Die Proteine wurden über SDS-PAA-Gele getrennt und mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt (5.2.4.3.2). Es standen nur Phagenköpfe aus unterschiedlichen Präparationen zur Verfügung, da die übliche Methode zur Anreicherung von Phagen (vergl. 5.1.2.1) bei LP7, A2f und KB1 häufig zur Trennung von Phagenköpfen und -DNA im CsCl-Gradienten führte. Daher konnte die Analyse nicht sehr vertieft werden. Die erhaltenen Proteinmuster (Fig. 4a) waren jedoch nahezu identisch. Insbesondere die mengenmäßig dominierenden Banden der Hauptkopfproteine (gp5, gp8) sind sehr einheitlich.

Die Vermutung, daß das Muster von ES18h1 Abweichungen zeigen würde, bestätigte sich. Die Verteilung der Banden wich so wesentlich von dem typischen Muster von P22 ab, daß keine einzige der Hauptkopfbanden wiedergefunden werden konnte. Eine naheliegende Erklärung bietet sich in der deutlich andersartigen Morphologie von ES18h1 mit seinem langen Schwanz an. Weitergehende Analysen der Proteinmuster wurden nicht angestellt, weil nach den ersten Ergebnissen von diesen Daten keine besonderen Hilfen für das eigentliche Thema der Arbeit erwartet werden konnten.

7.2.2 Analyse der Restriktionsmuster der DNA von verschiedenen Phagen

Gereinigte DNA der verschiedenen Phagen wurde mit dem Restriktionsenzym PstI gespalten und auf einem Agarosegel (0.9 %) getrennt. Das Ergebnis ist in Fig. 4b wiedergegeben. Die Wanderungsstrecken der einzelnen Banden wurden gemessen und die Fragmentgrößen im Vergleich zu den bekannten Größen der EcoRI-Fragmente von P22-DNA berechnet (Tab. 4). Durch den direkten Vergleich der Restriktionsmuster sollten Ähnlichkeiten der DNA einzelner Phagen aufgespürt werden. Tatsächlich erweisen sich einige der Muster als ähnlich und

fenden Phagen hin. Die Spaltungsmuster der DNA von A2f und A3 können (mindestens bei der mit Restriktionssenzymen mit hexamerer Erkennungssequenz möglichen Auflösungsgenauigkeit) als identisch angesehen werden, ebenso diejenigen von L und A1a. Eine vergleichsweise große Ähnlichkeit haben auch die Muster von LP7 und P22. Nimmt man P22 als Referenz, so treten die PstI-Banden A, B und E auch bei LP7, A2f und A3 auf. Die Spaltungsmuster von ES18h1 und KB1 allerdings weichen in ihrer Bandenverteilung erheblich von den Mustern der übrigen Phagen ab und haben auch untereinander keine auffallenden Gemeinsamkeiten.

Fig. 4a. **Proteinmuster verschiedener Salmonella-Phagen**

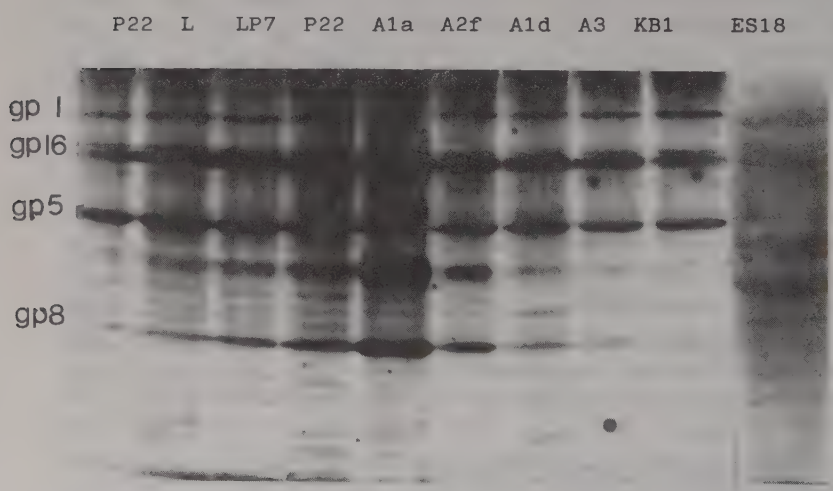
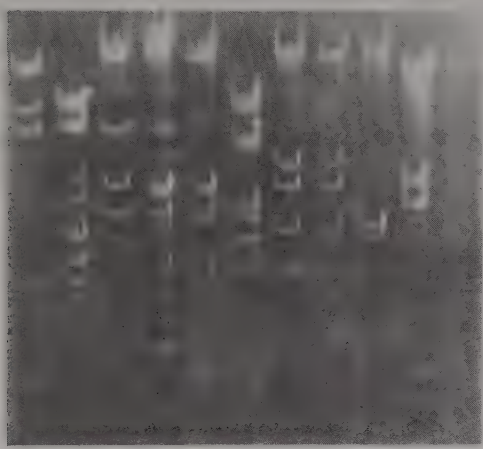
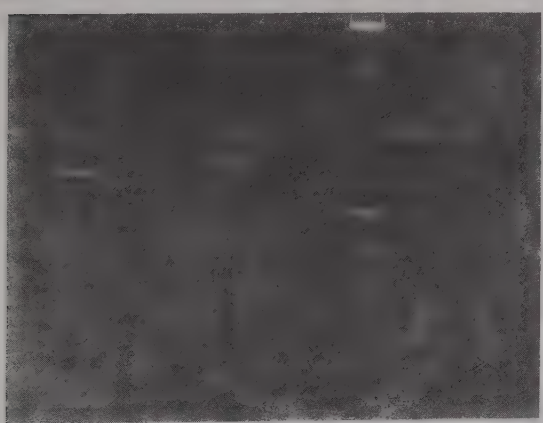


Fig. 4b. **PstI-Restriktionsmuster der DNA verschiedener Salmonella-Phagen** (M = Marker: EcoRI gespaltene P22-DNA)



1: LP7 (EcoRI)
2: LP7 Klarplaque
3: LP7 wt
4: P22
5: ES18h1
6: A3
7: A2f
8: A1a
9: KB1
10: L

Fig. 4c. **Vergleich von LP7 PstI-D1, D2 und D1+D2 (D)**



Tab. 4. **Größen der PstI-Fragmente der DNA der Phagen P22, LP7, L, A1a, A2f, A3, KB1 und ES18h1** (in bp). Als Größenstandard dient mit EcoRI gespaltene P22-DNA. Unterrepräsentierte Banden (vergl. Fig. 1b,c) sind gekennzeichnet (*) und bleiben bei der Summierung der Fragmente unberücksichtigt (Fig. 1b). Die Längen der großen Fragmente (> 10 kb) sind aufgrund der erzielbaren Meßgenauigkeit nur annähernd korrekt. Die Größenberechungen wurden mit dem Pascal-Programm "FANAL" durchgeführt. Die mit "**" markierten Banden von LP7 werden weiter unten (vergl. 7.3) genauer betrachtet.

P22 EcoRI	P22 PstI	LP7 PstI	L PstI	A1a PstI
A 19950	A 24500	A 24500	A 27900	A 27900
B 9490	B 4300	*7310	B 3340	B 3340
C 7340	C 4050	B 4300	C 3250	C 3250
D*4080	D 3520	C 4050	D 3100	D 3100
E 2450	E 2500	D1**3340	E 1540	E 1540
F 1150	F *1810	D2**3170		
G 1100	G 1630	E 2550		
H 860	H 1190	F *1810		
	I 560	G 1630		
		H 1190		
		I 640		
		J 560		
42340	42300	42940	39140	39140 (bp)

A2f PstI	A3 PstI	KB1 PstI	ES18h1 PstI
A 24500	A 24500	A 16530	A 10300
B 5200	B 5200	B 13180	B 9240
C 4300	C 4300	C 4430	C 6730
D 3170	D 3170	D 3720	D 6220
E 2440	E 2440	E 1400	E 3720
F 1100	F 1100	F 1020	F 3430
G 640	G 640		G 3020
H 560	H 560		H 2550
			I 1670
			J 1570
41910	41910	40280	48450 (bp)

Sowohl die Verteilung der DNA-Fragmente (Fig. 4b) wie die Berechnung der Fragmentgrößen (Tab. 4) deutet darauf hin, daß auch bei diesem Vergleich besonders ES18h1 aus dem Rahmen fällt. Die Summe der Fragmente ergibt ein deutlich höheres Molekulargewicht als bei den übrigen Phagen. Deren DNA ist stets etwa gleich lang wie die von P22 (oder etwas kleiner), während ES18h1 im selben Größenbereich wie Lambda (48,502 bp) liegt. Dies bestätigt - wie die übrigen Daten über ES18h1 - , daß dieser Phage wohl nicht zu den unmittelbaren Verwandten von P22 zu zählen ist.

Es hätte im Rahmen dieser Arbeit zu weit geführt, alle oben genannten Phagen hinsichtlich der pac Signale im Detail zu untersuchen. Vielmehr ging es zunächst darum, exemplarisch für einen mit P22 verwandten Phagen ein System zu erarbeiten, das es erlaubt, biologische und biochemische Parameter eines verwandten Phagen im wesentlichen im Verhältnis zu P22 zu erfassen. Daher ist als Bezugssystem stets P22 gewählt.

Diese Art von experimentellem Ansatz geht davon aus, daß sich P22 zu pac Signalen von verwandten Phagen prinzipiell ähnlich verhält wie zu seinem eigenen. Es kann daher nur etwas über die DNA-Verpackung bei P22 ausgesagt werden, nicht aber über die Verpackung des oder der anderen Phagen per se. Freilich lassen sich darüber in einem Analogieschluß Vermutungen anstellen. Da jedoch P22 als Modellsystem gut eingeführt ist, erscheint dieses Verfahren als durchaus sinnvoll.

Aus Gründen, die im folgenden ausgeführt sind, wurde der Phage LP7 für detaillierte Untersuchungen ausgewählt.

7.3 Spezielle Untersuchungen an dem Phagen LP7

Hauptsächlich zwei Besonderheiten bei LP7, die während der allgemeinen biologischen und biochemischen Charakterisierung auffielen, weckten das Interesse an einer eingehenderen Beschäftigung mit diesem Phagen: eine gegenüber den übrigen Phagen auffallende "Uneinheitlichkeit" der Lysate von LP7 und das DNA-Muster der Spaltung mit PstI. Auch die Transduktionsdaten zeigen deutliche Unterschiede zu P22 (siehe Tab. 2).

7.3.1 Plaquevariabilität bei LP7

Zunächst fiel die hohe Variabilität der Plaques (z.B. bei Titrationen von Phagenlysaten) auf. Zum einen war ihre Größe oft sehr verschieden, zum anderen waren sehr unterschiedliche Mengen an klaren Plaques unter den (normalerweise) trüben Wildtyp-Plaques von LP7 zu finden. Um auszuschließen, daß es sich hierbei um zufällige Effekte handelt, wurde ein "Mehrstufenwachstumsexperiment" durchgeführt. Ausgehend von jeweils einem trüben und einem klaren Einzelplaque aus einem Lysat von Wildtyp LP7, die in einer Kultur von DB21 gewachsen waren, wurde das Verhältnis von trüben zu klaren Plaques über drei Generationen von Nachkommen verfolgt. Zunächst wurde je ein isolierter Einzelplaque in 1 mL VF suspendiert und auf dem Stamm DB21 titriert. Danach wurden je drei folgende Vermehrungszyklen (in Lysaten von 10 mL LB) in DB21-Kulturen durchgeführt und auf demselben Stamm titriert. Eine Bakterienkultur in der log-Phase wurde jeweils aus dem vorausgegangenen Lysat mit einer m.o.i. = 1 infiziert. Die Ergebnisse sind in der Tab. 5 zusammengefaßt; sie zeigen auf den ersten Blick, daß der Anteil an klaren Plaques bei der Nachkommenschaft des ursprünglich trüben Einzelplaques stark zunimmt, während alle Nachkommen des klaren Plaques wieder klar sind.

In weiteren Experimenten wurde festgestellt, daß zusätzlich eine Korrelation zwischen dem verwendeten Wirt und dem Verhältnis von trüben zu klaren Plaques bereits in der ersten Generation der Phagen besteht. Dabei variiert der Anteil an trüben Plaques von 50 % bis nahezu 100 % (Tab. 5). DNA von Phagen, die auf verschiedenen Wirten gewachsen sind,

unterschied sich in dem relativen Anteil der beiden unterrepräsentierten EcoRI-Banden D (Daten nicht gezeigt). Phagen, die zu einem klaren Plaque führten, hatten regelmäßig unterschiedlich große Deletionen im mittleren Bereich des Genoms (vergl. Fig. 1a). Diese Untersuchungen wurden jedoch nicht weiter vertieft, da sie vom Hauptthema wegführen.

Tab. 5. **Plaquevariabilität von LP7**

	ursprünglicher Plaque von LP7			
	trüb		**klar**	
	trüb	klar	trüb	klar
Einzelplaque (DB21)	97 %	3 %	0 %	100 %
1. Generation (DB21)	80 %	20 %	0 %	100 %
2. Generation (DB21)	63 %	37 %	0 %	100 %
3. Generation (DB21)	35 %	65 %	0 %	100 %
LT2	50 %	50 %	(nach einer Generation)	
CC4423	99 %	1 %	(nach einer Generation)	
CC4412recA	65 %	35 %	(nach einer Generation)	

7.3.2 Hinweise auf ein sie System bei LP7

Wie bereits bei dem Vergleich der Kreuzimmunität aller acht Phagen angedeutet wurde, spricht der vollständige Ausschluß des Wachstums heteroimmuner Phagen bei Anwesenheit eines lysogenen LP7 für die Existenz eines zu P22 (Rao, 1968) analogen sie Systems bei LP7. Nach den Ergebnissen von Susskind et al. (1974a) funktioniert bei P22 das sieA System derart, daß superinfizierende Phagen bereits bei der Injektion der DNA in die P22-lysogene Zelle blockiert werden.

Die Tatsache, daß ES18h1 als einziger untersuchter Phage auf DB21::LP7 Plaques bilden kann, spricht nicht gegen diese Hypothese. Es ist nämlich bekannt (Kuo und Stocker, 1970), daß ES18 eine vollkommen andere Spezifität der Adsorption an die Wirtszelle hat als die anderen Phagen. ES18h1 verhält sich indifferent gegenüber der Lipopolysaccharidschicht (LPS) von Salmonella typhimurium , während P22 und andere Phagen des Typs A O-spezifisch (Erikson et

al., 1979) sind (vergleiche Diskussion).

7.3.3 Untersuchung der DNA von LP7

Auch die detaillierte Untersuchung der DNA von LP7 förderte einige interessante Phänomene zutage. Um besser isolierte Teile der DNA von LP7 untersuchen zu können, wurden die PstI-Fragmente mit dem Vektor pBR325, der ebenfalls mit PstI gespalten war, ligiert. Unter diesen Bedingungen war das Fragment PstI-A (vermutlich entweder wegen seiner Größe von 24.5 kb, vergl. Tab. 4 oder auf diesem Fragment enthaltener letaler Funktionen) nicht klonierbar. Im weiteren Verlauf spielen vor allem die Klone der Fragmente PstI-B (pGM4013), PstI-C (pGM4005), PstI-D1 (pGM4002), PstI-D2 (pGM4003) und PstI-J (pGM4012) eine wichtige Rolle (vergl. 4.3 und Fig. 2).

Im Unterschied zu den DNA-Mustern der anderen Phagen beobachtet man bei der Spaltung mit PstI eine breite, vergleichsweise unscharfe Bande D, die auch nicht äquimolar zu den übrigen Banden erscheint (Fig. 4b). Beim Vergleich mehrerer unabhängig voneinander hergestellter Präparationen von LP7-DNA (aus verschiedenen Lysaten) konnte außerdem beobachtet werden, daß die Bande PstI-D in ihrem Laufverhalten etwas variabel ist. Das zeigt sich daran, daß von einer einzigen breiten ("verschmierten") Bande über eine ansatzweise zu erkennende Doppelbande bis hin zu zwei distinkten Banden Pst-D1 und Pst-D2 alle Zwischenstufen auftreten. Zum Vergleich wurden die PstI-Fragmente D1 und D2 aus den Klonen pGM4002 und pGM4003 wieder mit PstI herausgespalten, über ein Agarosegel isoliert und anschließend mit den Enzymen TaqI, HaeIII und Hinf weiter gespalten. Parallel zu den Spaltungen der beiden isolierten D-Fragmente wurde PstI-D aus Gesamt-Phagen-DNA isoliert und ebenfalls mit den genannten Enzymen gespalten. Auf einem 1.5 % Agarosegel wurden jeweils die entsprechenden Spaltungen nebeneinander aufgetrennt und miteinander verglichen (Fig. 4c). Als Ergebnis läßt sich eindeutig festhalten, daß außer den beiden Fragmenten D1 und D2 keine weiteren Fragmente in der PstI-Bande D verborgen sind, weil in dem Spaltmuster der Gesamt-D-Bande keine weiteren Banden auftreten als in den Gel-Spuren der Einzelbanden.

Die Summe aller PstI-Fragmente (mit Ausnahme des unterrepäsentierten Fragmentes E) ergibt mit ca. 46 000 bp ein deutlich höheres Molekulargewicht als bei den übrigen Phagen. Dieses Ergebnis widerspricht jedoch den EM-Aufnahmen und dem Proteinmuster des Phagenkopfes, weil man danach von einer weitgehenden Ähnlichkeit der Größenverhältnisse ausgehen muß. Rechnet man jedoch das Fragment PstI-D nur einmal bei der Bilanzierung, dann erhält man ein MW in der Größenordnung von P22 (42 500 bp).

Gegen die Vermutung, daß es sich bei diesen beiden Banden um Start- und/oder Terminationsfragmente (vergl. Fig. 1b und 1c) infolge von DNA-Verpackungsereignissen handelt, spricht u.a. die Tatsache, daß sie als PstI-Fragmente klonierbar waren. Start- und Terminationsfragmente sollten aber nur an einem Ende eine PstI-Stelle haben, während das andere Ende das Ergebnis eines pac Schnittes ist.

7.3.4 Transduktionstests erf recA

Die Selektion von Fragmenten der Phagen-DNA, die ein pac Signal tragen, erfolgt nach dem erf recA Verfahren (siehe 5.1.3.2; beschrieben auch bei Schmidt und Schmieger, 1984). Das Verfahren zielt darauf ab, aus einer Genbank von Phagen-, Bakterien- oder auch Transposon-DNA diejenigen Klone herauszufinden, die ein Signal enthalten, das P22 erf Phagen, die auf plasmidtragenden Stämmen vermehrt werden, als Startstelle für einen Verpackungsvorgang benutzen. Die dazu verwendeten erf Phagen wurden auf hisHB22 vermehrt, um einen von der Signalerkennung unabhängigen bakteriellen Marker zur Normierung der Transduktionsergebnisse zur Verfügung zu haben. Nach der Vermehrung auf hisHB22 können keine his-transduzierenden Partikel in dem Lysat enthalten sein. Daher gibt die Anzahl an his-Transduktanten (gemessen auf dem Empfängerstamm hisHB22) nach der Vermehrung in dem Stamm CC4412 recA (his^{+}!) mit den zu testenden Plasmiden Auskunft über die Vermehrungsrate der erf Phagen in diesem Stamm.

Mit den aus den CC4412 recA Kulturen erhaltenen erf Lysaten wird der Empfängerstamm hisHB22 infiziert und nach Bebrüten entsprechender Verdünnungen (vergl. 5.1.3.2) einerseits die Zahl der Kolonien bestimmt, die nur aufgrund von

Plasmidtransduktion auf den selektiven Platten wachsen können und andererseits his^+ Kolonien, die auf Minimal-Medium wachsen. Nach Beobachtungen von Orbach und Jackson (1982) kann davon ausgegangen werden, daß es unter wenig stringenten Bedingungen zu Plasmidtransduktion durch Rekombination der klonierten Phagen-DNA (entweder P22-DNA selbst oder solche von P22-verwandten Phagen wie LP7) mit der DNA des infizierenden Phagen kommt.

Um solche Effekte von vorneherein auszuschließen, wurden für diesen Typ von Transduktionstest ausschließlich Phagenlysate hergestellt unter der Bedingung, daß sowohl die wirtseigene recA - wie die phagenkodierte erf Rekombinationsfunktion ausgeschaltet waren. In der Tat zeigt sich im Vergleich zu einem rec^+ Donor eine beträchtliche Verminderung der absoluten Transduktantenzahlen um etwa den Faktor 100. Auch mit gemischten Rekombinationsbedingungen, bei denen entweder nur beim Wirt oder nur beim infizierenden Phagen die Rekombination ausgeschaltet war, erhält man einen hohen Anteil an scheinbar positiven Transduktanten, die nur durch Rekombination entstehen (Schmidt und Schmieger, 1984), aber kein echtes pac Signal tragen.

Ein unter den erf recA Bedingungen häufig beobachtbares Problem bildet der Umstand, daß die Phagen sich wegen der behinderten DNA-Replikation (Weaver und Levine, 1977a,b) äußerst schlecht vermehren. Offenbar werden jedoch die späten Phagenfunktionen halbwegs normal durchgeführt, so daß die DNA-Verpackung der replizierten DNA (sowohl DNA vom Phagen wie vom Bakterium) stattfindet. Um zu gewährleisten, daß trotz der im folgenden aufgeführten Gründe die Suche nach Fragmenten von LP7 mit pac Signal-Eigenschaften möglichst alle klonierten Bereiche umfaßt, mußten in die Versuchsreihe einige Sicherungen eingebaut werden.

Die Effizienz der Transformation von S.typhimurium mit Plasmid-DNA ist mindestens um den Faktor 10 schlechter als bei geeigneten Stämmen von E.coli . Deshalb wurde ein Umweg beschritten und nach der Ligierung der PstI-Fragmente von LP7-DNA in dem Plasmid pBR235 zunächst der Stamm E.coli 490A als Transformationsempfänger benutzt. Um in diesem System Zwangsbedingungen (d.h. Bedingungen, die zum Verlust einzelner PstI-Fragmente beispielsweise wegen der Größe und

dem entsprechend überproportionalen Auftreten anderer Fragmente in der Mischung führen) möglichst zu eliminieren, wurden sowohl ein Gemisch (sog. "shotgun-Klonierung") aller neukombinierten Plasmide als auch isolierte Klone mit identifizierten PstI-Fragmenten zur Transformation eingesetzt. Durch den Umweg über die Akkumulation von Plasmid-DNA in E.coli konnten ausreichende Mengen an DNA erhalten werden, die zur Transformation des S.typhimurium Stammes CC4412 recA ausreichten. Nach der Transformation wurde jeweils getestet, ob die erwarteten Plasmide auch tatsächlich in dem Salmonella-System wiedergefunden werden konnten und ob der transformierte Stamm noch sensitiv für P22 war. Aufgrund von nicht näher untersuchten biologischen und/oder medienabhängigen Ursachen war bei dem transformierten Stamm CC4412 recA unregelmäßig Resistenz gegen P22 zu beobachten, weshalb vergleichbare Experimente zur Plasmidtransduktion möglichst in einer Versuchsreihe durchgeführt werden mußten.

P22-sensitive Transformanten konnten für die Herstellung von kleinen Lysaten eingesetzt werden. Die Infektion erfolgte mit einem Lysat von P22 erf c2 (gezogen auf den Stämmen DB21 oder hisHB22), das ursprünglich von einem Einzelplaque stammte und höchstens zwei Replikationszyklen durchlaufen hatte. Läßt man erf Phagen mehrere Replikationszyklen durchlaufen, wächst die Gefahr, daß der Anteil an revertierten Phagen ansteigt, da unter den gewählten Bedingungen ein starker Selektionsdruck für Revertanten zum erf^+-Phänotyp besteht. Das verwendete Lysat war jeweils durch paralleles Titrieren auf den Stämmen DB21 und CC4412 recA als Indikatorstämme daraufhin untersucht, daß es möglichst wenig Revertanten enthielt. Mit solch einem geprüften P22 erf Lysat wurden logarithmisch wachsende Kulturen der plasmidtragenden Stämme mit einer m.o.i. von <10 infiziert und 90 min bei 34°C geschüttelt. Die Titer der Lysate wurden für die spätere Berechnung der Transduktionshäufigkeiten bestimmt.

Die Transduktionen wurden (wie in 5.1.3.2 beschrieben) mit dem Stämmen hisHB22 ::H1 oder hisHB22 ::sie als Empfänger durchgeführt. Als pac site-unabhängige Vergleichsgröße bei erf Phagen, die auf dem Stamm hisHB22 vermehrt worden waren, wurde die Transduktion des his

Markers ermittelt, indem jeweils 0.01 mL des Transduktionsansatzes auf eine M9-Platte verteilt wurden. Als negative Kontrolle wurde ein P22 erf Lysat auf einer Kultur von CC4412 recA gezogen, der nur den Vektor pBR325 oder pUC8 enthielt; als positive Kontrolle wurde ein P22 erf Lysat hergestellt auf dem Stamm CC4412 recA , der den Klon pGM1000 (enthält in einem HindIII-SmaI-Fragment das Gen 3 und damit die P22 pac site, vergl. Fig. 1b) trägt. Zur weiteren Kontrolle wurde der Empfängerstamm ohne Plasmid auf M9- bzw. selektiven LB-Platten geprüft.

Im Unterschied zu den äußerst geringen Transduktionswerten (0 - 10 Transduktanten/mL Transduktionsansatz), die man mit dem reinen Vektorplasmid erhält, findet man bei Klonen, die DNA-Fragmente des Phagen enthalten, entweder sehr hohe Transduktantenzahlen (> 2.000/mL) oder aber niedrigere Werte (20 - 400/mL). Diese niedrigen Transduktionswerte sind offenbar darauf zurückzuführen, daß vereinzelt unter den P22 erf c2 Phagen Revertanten im P22 erf Gen auftreten. Dadurch kann es zur homologen Rekombination zwischen den Phagen und den Plasmiden mit den klonierten Phagenfragmenten kommen, was u.U. zu Transduktanten führt, die ap- bzw. tc-resistent sind, aber nicht aufgrund eines auf dem Plasmid enthaltenen pac Signals verpackt worden sind, sondern über Kointegratbildung zwischen Phagen- und Plasmidanteilen. Im weiteren wird auf solche Vorgänge als "Nicht-Transduktion" im Gegensatz zur pac abhängigen (hohen) "Transduktion" Bezug genommen.

Das Ergebnis dieser Transduktionsversuche ist in der Tab. 6 wiedergegeben.

Tab. 6. **Verpackungseigenschaften von Fragmenten von LP7 und HT103/2 DNA** (zu den in den pGM-Plasmiden enthaltenen DNA-Fragmenten cf. Übersicht 4.3 und Fig. 2)

a	b	c	d
Klon	Fragment	T/P x 10^{-7}	his^+/Plasmid Transduktanten
pGM4001	PstI-D1+J	530	0.85
pGM4002	PstI-D1	430	8.5
pGM4004	TaqI-D1	1,200	2.6
pGM4012	PstI-J	8	420
pGM4003	PstI-D2	3,600	0.83
pGM4011	TaqI-D2	180	5.8
pGM4005	PstI-C	2,200	0.9
pGM4008	EcoRV-C	2,400	1.3
pGM4006	EcoRV-C(l)	2	16
pGM4007	EcoRV-C(r)	1,800	0.12
pGM4014	EcoI-C(m)	400	5.7
pGM4013	PstI-B	12	-
pGM4009	HT103/2-TaqI(+)	2,800	0.12
pGM4010	HT103/2-TaqI(-)	2,100	0.8
pBR325	-	<0.1	>472
pUC8	-	2	130
pPST-8	P22 PstI-C	9,000	0.1

Aufgrund der Ergebnisse ist festzustellen, daß die Fragmente PstI-C (pGM4005), PstI-D1 (pGM4002) und PstI-D2 (pGM4003) ein pac Signal enthalten, während die übrigen PstI-Fragmente keine solchen Signale tragen. Das Plasmid pGM4001 enthält die Fragmente PstI-D1 und J und wird gleichfalls transduziert, während ein Plasmid (pGM4012), das nur das Fragment

J trägt, nicht transduziert wird. Daraus folgt, daß das Signal, das für die Plasmidtransduktion unter diesen Bedingungen erforderlich ist, im Plasmid pGM4001 nicht auf dem Fragment PstI-J, sondern auf dem Teil PstI-D1 enthalten ist.

Um sicherzustellen, daß in den Transduktanten auch tatsächlich die gleichen Klone pGM 4001, 4002, 4003 u.s.w. wie in den ursprünglichen Spenderkulturen vorhanden sind, wurden die Klone durch Schnellpräparationen aus Kulturen der entsprechenden Transduktanten isoliert und identifiziert (5.2.2.1).

Das EcoRV-Fragment aus dem Fragment PstI-C mit ca. 2200 bp Länge (siehe Fig. 2), das anschließend auch sequenziert wurde (siehe 7.4), lag sowohl als Klon in M13mp18 wie in pUC8 (jeweils in die SmaI-Schnittstelle kloniert) vor und wurde in der Plasmidversion (pGM4008) in dem Transduktionstest überprüft (Tab.6). Dabei verhielt es sich positiv. Dies konnte erwartet werden, da im Hybridisierungsexperiment radioaktiv markiertes Plasmid pGM1000 nur mit diesem EcoRV-Fragment hybridisierte (Fig. 6). Die gefundene Anzahl an Transduktanten wich nur unwesentlich von derjenigen des Ausgangsklones (pGM4005) ab. Dies bestätigt nebenbei frühere Befunde (Schmidt und Schmieger, 1984), daß unter recA erf Bedingungen die Plasmidgröße eine weitgehend vernachlässigbare Rolle spielt. Nachdem die ersten Sequenzdaten über das Gen 3 (LP7) vorlagen (siehe Abschnitt 7.4.1), wurden zur weiteren Eingrenzung des Bereiches, der das pac Signal enthält, Teilabschnitte der Gen 3 Sequenz in pUC8 bzw. pUC19 kloniert. Das Plasmid pGM4006 enthält den Teilabschnitt von Pos. bp -218 bis 195 (vergl. Fig. 8, entspricht dem 5'-seitigen Teil der Sequenz von Gen 3 (LP7)) und wird nicht transduziert (Tab. 6). Der Klon pGM4007 (Fig. 2) enthält den Abschnitt von Pos. 99 bis 1992 und wird transduziert. Ein dritter Klon enthält einen wesentlich kürzeren Teil der Sequenz (Pos. bp 232 bis 386) und wird ebenfalls transduziert (Tab. 6).

7.3.5 Weitere Untersuchung der drei PstI-Fragmente C, D1 und D2 von LP7

Das Auffinden von drei verschiedenen DNA-Fragmenten von LP7 mit einem für P22 erkennbaren pac Signal stellt einen wesentlichen Unterschied zur Situation bei P22 dar, wo unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen nur das Fragment PstI C(P22) transduziert wird (Schmidt und Schmieger, 1984). Aufgrund der Größengleichheit beider PstI C-Fragmente bei P22 und LP7 liegt bei der sonstigen hohen Übereinstimmung des Spaltmusters die Vermutung nahe, daß beide Fragmente auch dieselben Funktionen tragen. Daß diese Vermutung zutrifft, konnte auf drei verschiedene Weisen gezeigt werden:

a) P22am3-Phagen können sich auf CC4412 recA (pGM4005) ebenso vermehren wie auf CC4412 recA (pGM1000), während sie dies auf den Stämmen CC4412 recA (pGM4001, pGM4002, pGM4003) nicht können.

b) Die DNA-DNA-Hybridisierung (siehe 5.2.7 und 5.2.8) zeigt, daß es bei der Hybridisierung von PstI-gespaltener und auf Nitrocellulosefilter übertragener DNA von LP7 mit pGM1000 als radioaktiver Sonde ein Signal mit der Bande PstI C(LP7), nicht aber mit PstI D1 oder D2 gibt (Fig. 6). Im umgekehrten Versuch (radioaktiv markiertes Plasmid pGM4005) erhält man Hybridisierung mit PstI-C(P22) und EcoRI A und D(P22) (Fig. 1b). Auf diesen Fragmenten ist das Gen 3 (P22) oder ein Teil davon lokalisiert worden (Jackson et al., 1978; Schmidt und Schmieger, 1984; Backhaus, 1985). Eine weitere Eingrenzung des relevanten Bereiches im Fragment PstI C konnte durch eine Subklonierung erzielt werden. DNA von LP7 wurde zu diesem Zweck zunächst mit mehreren Restriktionsenzymen mit hexamerer Erkennungssequenz gespalten, anschließend auf einem Agarosegel (0.8 %) aufgetrennt und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen. Als Hybridisierungssonde wurde wiederum pGM1000 (Fig. 1b) eingesetzt. Nach dem Ergebnis dieser Hybridisierung (Fig. 6) wurde ein EcoRV-Fragment von etwa 2.2 kb Länge ausgewählt, weil es unter den hybridisierenden Fragmenten relativ das kleinste war und es nur mit diesem Fragment ein Signal gab, während bei anderen Spaltmustern entweder zwei Banden mit pGM1000 hybridisierten oder die eine hybridisierende Bande wesentlich größer als das EcoRV-Fragment war. Nach der Klonierung in die SmaI-

Stelle von pUC8 wurde der erhaltene Klon (pGM4008) zur Kontrolle auch dem biologischen erf recA Transduktionstest unterworfen und erwies sich erwartungsgemäß als transduzierbar.

c) Die Sequenzierung der DNA aus diesem Bereich von LP7 zeigt so weitgehende Sequenzhomologien zu Gen 3 (P22), daß dem Fragment PstI C(LP7) u.a. die Funktion von Gen 3 (LP7) zugewiesen werden kann (cf. dazu die ausführlichen Ergebnisse der Sequenzanalyse, Fig. 8).

7.3.6 "Subklonierung" der PstI-Fragmente D1 und D2

Da über die biologischen Funktionen, die auf den Fragmenten D1 und D2 kodiert sind, nichts weiter bekannt ist als der Befund, daß beide wegen eines pac Signales transduzierbar sind, erschien es interessant, auch diese Fragmente näher zu untersuchen.

Im einem Hybridisierungsexperiment (Fig. 4d) mit dem radioaktiv markiertem TaqI-Fragment aus pGM4004, das als Subklon von pGM4002 (siehe unten) erzeugt wurde, erhielt ich bei den PstI-Fragmenten von LP7-DNA nur ein Signal mit PstI-D; von den EcoRI-Fragmenten von P22 hybridisierte Fragment B mit pGM4004, von den EcoRI-Banden von LP7 hybridisierte stark ein Fragment mit ca. 4.2 kb und schwach ein Fragment von ca. 1.8 kb Länge.

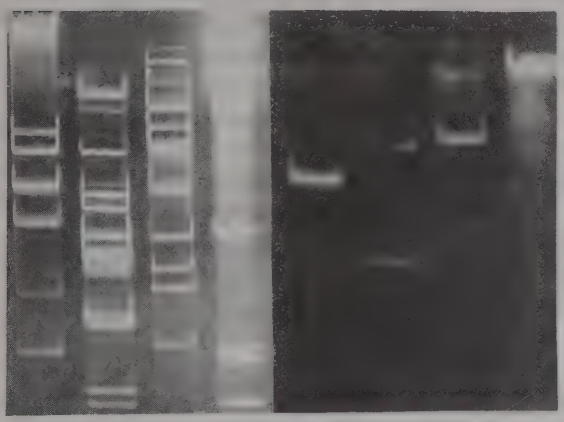
Mit jeweils ca. 3.8 kb Länge waren die Fragmente jedoch zu groß für den direkten Versuch einer Lokalisation des pac Signales. Deshalb wurden die Fragmente D1 und D2 aus den Klonen pGM4002 bzw. pGM4003 präparativ isoliert und mit mehreren Restriktionsenzymen (HinfI, TaqI und HaeIII) gespalten. Bei beiden Fragmenten schien jeweils die Verteilung der TaqI-Subfragmente für die weitere Untersuchung am besten geeignet. Im "shotgun-Verfahren" wurden beide Fragmentgemische jeweils in dem Vektorplasmid pUC8 (Vieira und Messing, 1982), das einmal mit dem Restriktionsenzym AccI und das andere Mal mit AccI und PstI gespalten war, kloniert und mittels des X-Gal-Farbtestes und der ap-Resistenz selektiert. Durch die Verwendung eines Vektors, der mit AccI und PstI gespalten war, sollte sichergestellt werden, daß auch die Randfragmente, die auf einer Seite ein PstI-Ende

und auf der anderen ein TaqI-Ende aufweisen, klonierbar waren. Es konnte nicht a priori ausgeschlossen werden, daß sich das jeweilige pac Signal etwa in einem Randfragment befindet.

Analog zu dem oben dargestellten Verfahren der erf recA -Transduktion wurden auch die nach dieser Klonierung erhaltenen Plasmide geprüft. Es konnte jeweils mehrfach ein und nur ein TaqI-Fragment identifiziert werden, das unter diesen Bedingungen transduziert wurde. Das Ergebnis dieser Transduktion ist in der Tab. 6 enthalten. Das in pGM4004 enthaltene TaqI-Fragment wurde anschließend sequenziert (siehe 7.4).

Fig. 4d. **Hybridisierung mit radioaktiv markiertem Plasmid pGM4004 gegen LP7- und P22-DNA.**

1a 2a 3a 4a 1b 2b 3b 4b



1a,b: LP7: PstI
2a,b: LP7: EcoRV
3a,b: LP7: EcoRI
4a,b: P22: EcoRI

7.4 DNA-Sequenzierung

7.4.1 Bestimmung der DNA-Sequenz der Gene 3 und 2 von LP7

Im wesentlichen wurden seit 1977 zwei Verfahren für die Sequenzierung von DNA etabliert. Das eine Verfahren ist das von Maxam und Gilbert (1977, 1980), bei dem einzelsträngige DNA auf chemischem Weg basenspezifisch modifiziert und gespalten wird, das andere ist die "Didesoxynukleotidmethode" von Sanger et al. (1977). Die letztere Technik weist gewisse Vorteile auf: zum einen kann man etliche hochtoxische Chemikalien vermeiden, da man enzymatisch arbeitet. Zum anderen erfordert die Methode erheblich weniger Arbeitsschritte, was sie zur Sequenzierung längerer Basenfolgen besonders geeignet erscheinen läßt.

Durch die Kombination der Sanger-Methode mit der Klonierung der zu sequenzierenden DNA in einzelsträngige Phagenvektoren wie M13 (Messing et al., 1981; Messing, 1983) oder in leicht zu vermehrende pUC-Plasmide (Vieira und Messing, 1982; Norrander et al., 1983) gewinnt man ein hohes Maß an Flexibiltät. Die M13-Phagen und pUC-Plasmide besitzen eine sogenannte Polylinkerregion, in der sich singuläre Erkennungssequenzen für eine Reihe von Restriktionsenzymen befinden (Fig. 5a). M13-Phagen oder pUC-Plasmide, in deren Polylinker erfolgreich inseriert wurde, können leicht durch einen einfachen Farbtest selektiert werden, da durch die Insertion fremder DNA das Leseraster des ß-Galaktosidasegens gestört wird. Deswegen wird im Medium enthaltenes X-Gal, das als Farbindikator benutzt wird, nicht mehr metabolisiert.

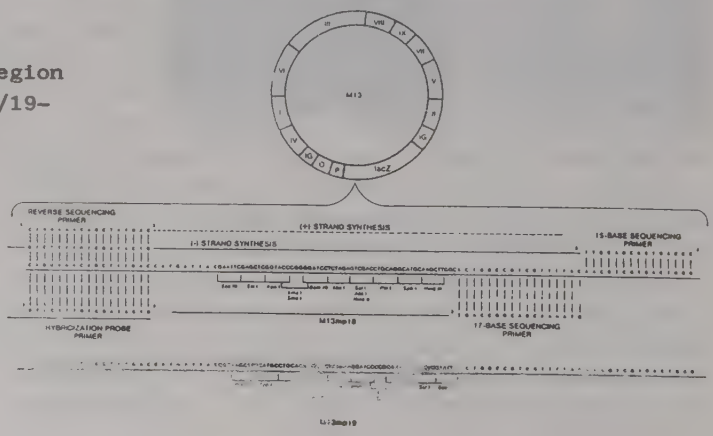


Fig. 5a. **Polylinkerregion von M13mp18/19-Phagen und pUC18/19-Plasmiden**

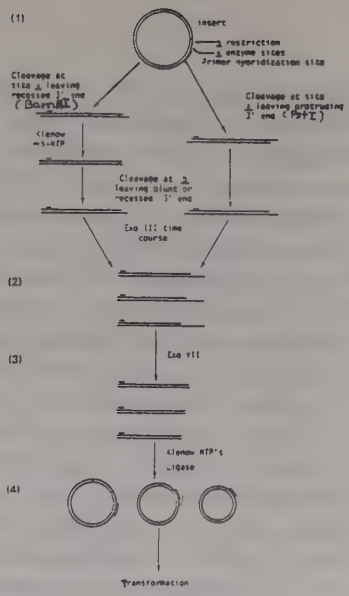


Fig. 5b. **Schematische Darstellung der Erzeugung gerichteter Deletionen in M13-Klonen zur anschließenden Sequenzierung** (vergl. 5.2.9; nach Yanisch-Perron et al., 1985)

Komplementär zu einer Folge von fünfzehn Basen unmittelbar vor der Polylinkersequenz ist ein "Universalprimer" (5'-dTCCCAGTCACGACGT -3'; Norrander et al., 1983) verfügbar, wodurch alle Sequenzierungsreaktionen von derselben Stelle aus gestartet werden können. Außerdem stand ein "reverser Primer" zur Verfügung (5'- dCAGGAAACAGCTATGAC -3'), mit dessen Hilfe Sequenzierungsreaktionen von der 3'-Seite in die inserierten Fragmente hinein durchgeführt werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System zunächst dazu benutzt, das Gen 3 des Phagen LP7 zu sequenzieren. Im recA erf Transduktionstest wurde der Klon, der das PstI-Fragment C enthält (pGM4005), als einer der Klone gefunden, die (hoch) transduziert werden (vergl. 7.3.4: erf Transduktion). Drei verschiedene Befunde sprachen dafür, daß gerade das PstI C-Fragment das Gen 3 (LP7) enthält: a) die Fragmente PstI C(P22) und PstI C(LP7) haben die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel; b) am3 (P22) Mutanten vermehren sich in DB21(pGM4005) und c) bei der Hybridisierung des PstI-Musters von LP7 mit radioaktiv markiertem pGM1000, der das Gen 3 (P22) enthält, gibt es ein ebenso starkes Signal mit PstI C wie mit PstI C(P22).

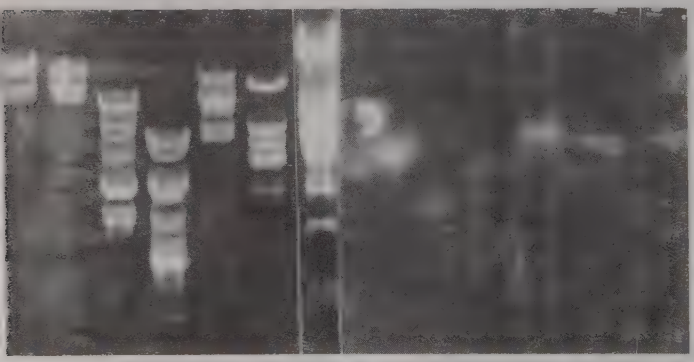
Die zweite an der Initiation der Verpackung von P22-DNA beteiligte Komponente ist das Produkt des Genes 2 (gp2; vergl. Einführung). Die Gene 3 und 2 werden gemeinsam

transkribiert und wurden als unmittelbar benachbarte Gene kartiert (Überblick in: Susskind und Botstein, 1978). Auch P22am2-Mutanten vermehren sich auf dem Stamm DB21(pGM4005), was dafür spricht, daß erstens das Gen 2 (LP7) (oder mindestens ein Teil) in dem Fragment PstI C(LP7) enthalten ist und zweitens homolog zu Gen 2 von P22 ist. Die Sequenz des Genes 2 (P22) ist bislang noch nicht ermittelt worden. Die entsprechende Sequenz von LP7 könnte jedoch für zukünftige Vergleiche von Nutzen sein. Außerdem konnte die Sequenz von Gen 2 (LP7) für Vergleiche mit dem Lambda-Gen A (siehe Fig. 13 und Diskussion) herangezogen werden.

Da das PstI C-Fragment (ca. 4.3 kb) noch mehr Information als die beiden Gene enthält, die in diesem Zusammenhang nicht so sehr interessiert, wurde durch Spaltung von LP7-DNA mit mehreren Restriktionsenzymen (AccI, AvaI, BstEII, ClaI, EcoRI, EvoRV, HindII, HindIII, HpaI, PvuII, SalI; Fig. 6) nach einem Spaltungsmuster gesucht, bei dem nur eine einzige, aber deutlich kleinere Bande als PstI C mit pGM1000 hybridisiert. Ein EcoRV-Fragment von etwa 2200 bp erschien dabei als gut geeignet.

Fig. 6. **Spaltmuster von LP7-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen und Hybridisierung mit pGM1000**

1a 2a 3a 4a 5a 6a 7a 1b 2b 3b 4b 5b 6b 7b



1a,b: P22 EcoRI
2a,b: LP7 EcoRI
3a,b: LP7 EcoRV
4a,b: LP7 HindII
5a,b: LP7 HindIII
6a,b: LP7 ClaI
7a,b: LP7 PstI

Dieses Fragment wurde präparativ isoliert und sowohl in pUC8 wie in M13mp18 (beide Male in die Stelle SmaI) kloniert. Da ein 2200 bp Fragment für die direkte Sequenzierung noch zu lang ist, mußten vorher kleinere Einheiten hergestellt werden. Das übliche Verfahren ist die sog. "shot-gun-Klonierung" (Messing et al., 1981) kleinerer Fragmente von je etwa 200 bp, die nach der Sequenzierung durch "überlappende" Sequenzen geordnet werden müssen. Es wurden jedoch inzwischen eine Reihe von Verfahren vorgeschlagen (Guo und Wu, 1983; Henikoff, 1984; Yanisch-Perron et al. 1985), die ein gezieltes oder geordnetes Verkürzen der zu sequenzierenden DNA erlauben. Für diese Arbeit wurde das Verfahren von Yanisch-Perron et al. gewählt, u.a. deshalb, weil durch die Verwendung von Exonuklease VII anstelle von Nuklease S1 besser reproduzierbare Ergebnisse bei der Verkürzung der Klone erzielt werden können.

Dazu wurden zwei verschiedene M13-Klone (mit dem EcoRV-Fragment in beiden Orientierungen) an zwei Stellen zwischen der Bindungsstelle des Universalprimers und der SmaI-Klonierungsstelle mit PstI und BamH1 gespalten (Fig. 5a). Anschließend wurden beide Ansätze mit Exonuklease III und VII (vergl. 5.2.9 und Fig. 5b) behandelt und wieder ligiert. Die dadurch entstandenen M13-Klone sind hinsichtlich der inserierten DNA unterschiedlich lang. Das Spektrum der Klone umfaßt alle Bereiche vom unverkürzten Insert bis zum 3'-Ende des Inserts. Die ssDNA der verschiedenen M13-Klone wurde im Agarosegel überprüft und daraufhin der Größe nach so sortiert, daß alle Bereiche des EcoRV-Fragmentes in Abstufungen von etwa 200 bp vorhanden waren. Von den ausgewählten M13-Klonen wurde Template-DNA präpariert, die zur Sequenzierung eingesetzt werden konnte. Im allgemeinen wurde ^{35}S-dATP (Biggin et al., 1983) zur Markierung verwendet, weil sich damit schärfere Banden, insbesondere im oberen Bereich der Sequenzgele, erzielen lassen, was zu einer wesentlich verbesserten Ablesbarkeit führt. Im Durchschnitt konnten (in Verbindung mit der "Keilgel"-Technik; siehe 5.2.4.3.3) auf diese Weise 200 - 320 bp abgelesen werden.

In Fig. 7a ist die Strategie der Sequenzierung des EcoRV-Fragmentes dargestellt. Alle Bereiche der Sequenz sind durch überlappende Klone und in beiden Richtungen bestimmt

worden. Die ermittelte Sequenz ist in beiden Strängen wiedergegeben (Fig. 8), um besser auf einige auffallende (mögliche) Sekundärstrukturen hinweisen zu können. Außerdem sind die drei vom Computer aus der DNA-Sequenz abgleiteten Leserahmen mit den entsprechenden Start- und Stoppsignalen angegeben, von denen die beiden längeren analog zur Situation bei P22 als Gene 2 (LP7) und 3 (LP7) bezeichnet werden, während ein kleiner Leserahmen vor dem Gen 3 (als LP7ORF1 bezeichnet), der sich im gleichen Leseraster wie Genprodukt 3 bis zum Anfang des EcoRV-Fragmentes zurückverfolgen läßt, zunächst nur als Möglichkeit betrachtet werden muß (siehe Diskussion).

Fig. 7. **Schematische Darstellung der Strategien, die zur Ermittlung der in dieser Arbeit untersuchten DNA-Sequenzen eingeschlagen wurden.** Die Pfeile geben Länge und Richtung der Sequenzierung an; zur Orientierung sind wichtige Positionen und Schnittstellen von Restriktionsenzymen vermerkt.

Fig. 7a. Strategie zur Bestimmung des EcoRV-Fragmentes mit den kodierenden Regionen der Gene 3 und 2 von LP7

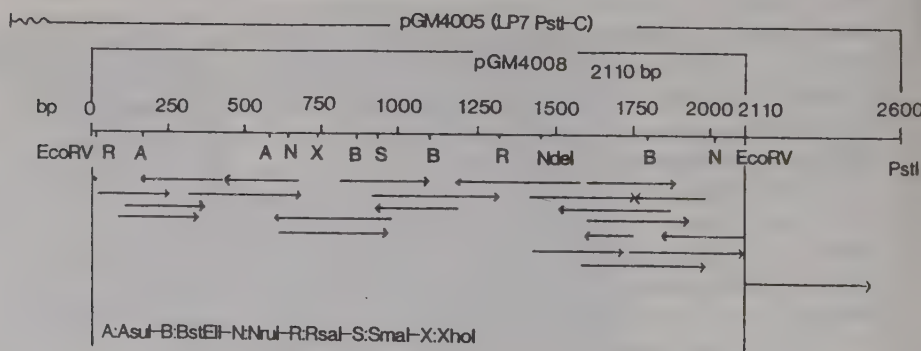


Fig. 7b. Strategie zur Bestimmung der Sequenz des Klones pGM4004

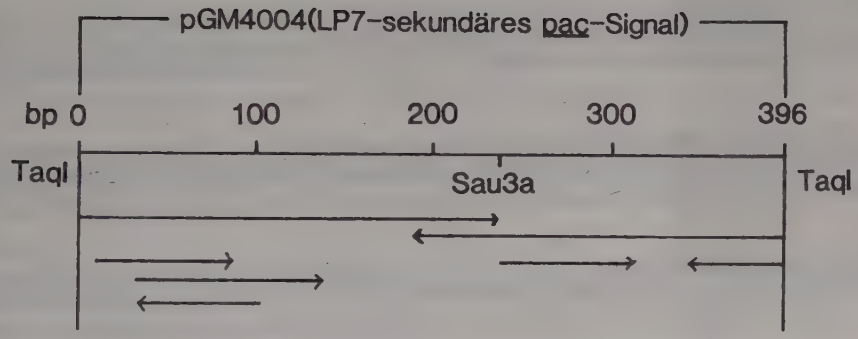
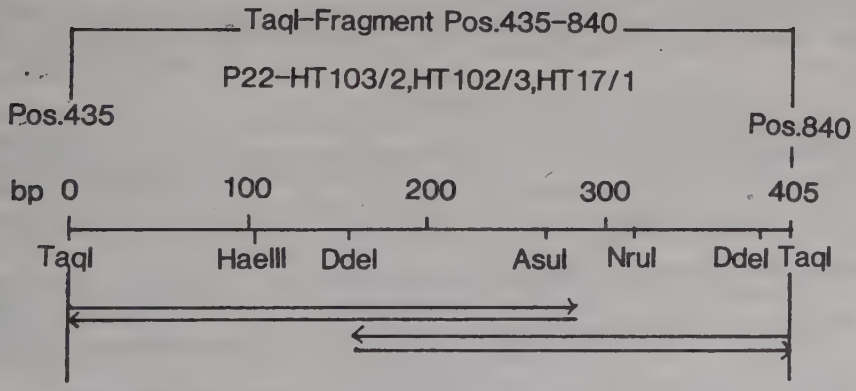


Fig. 7c. Strategie zur Bestimmung der Mutationsorte einer Reihe von P22 HT-Mutanten



-144
GATATCTGTTCCGGAGCCAGTACGGCGAGCTGCTCTATATGAGCAAGACAGCATTTGAAGCTAACTACACTTCTG
CTATAGACAAGGCCTCGGTCATGCCGCTCGACGAGATATACTCGTTCTGTCGTAAACTTCGATTGATGTGAAGAC
TyrLeuPheArgSerGlnTyrGlyGluLeuLeuTyrMetSerLysThrAlaPheGluAlaAsnTyrThrSerA
LP70RF1

-69
CAAGCGGTTCAGTAGCTAATGCAGAGACGGCGGATAAGTTATCTACTGCCCGCACTATCACACTAACCGGAGCGG
GTTCGCCAAGTCATCGATTACGTCTCTGCCGCCTATTCAATAGATGACGGGCGTGATAGTGTGATTGGCCTCGCC
laSerGlySerValAlaAsnAlaGluThrAlaAspLysLeuSerThrAlaArgThrIleThrLeuThrGlyAlaV

S-D
7
TCACAGGTTCAGCGTCCTTTGATGGTTCGGCTAACGTGACTATCGAAACAACATCAGGAGGTTAACTTATGGCAG
AGTGTCCAAGTCGCAGGAAACTACCAAGCCGATTGCACTGATAGCTTTGTTGTAGTCCTCGAATTGAATACCGTC
alThrGlySerAlaSerPheAspGlySerAlaAsnValThrIleGluThrThrSerGlyGlyTER MetAlaA
gp3

82
CACCAAAGGGCAACCGATTCTGGGAGGCCCGCAGTAGCCATGGGCGTAACCCGAAATTCGAGTCGCCTGAGGCGC
GTGGTTTCCCGTTGGCTAAGACCCTCCGGGCGTCATCGGTACCCGCATTGGGCTTTAAGCTCAGCGGACTCCGCG
laProLysGlyAsnArgPheTrpGluAlaArgSerSerHisGlyArgAsnProLysPheGluSerProGluAlaL

TaqI
157
TGTGGGCTGCTTGTTGTGAATACTTCGAGTGGGTGGAGGCTAACCCACTATGGGAGATGAAGGCTTTCTCATATC
ACACCCGACGAACAACACTTATGAAGCTCACCCACCTCCGATTGGGTGATACCCTCTACTTCCGAAAGAGTATAG
euTrpAlaAlaCysCysGluTyrPheGluTrpValGluAlaAsnProLeuTrpGluMetLysAlaPheSerTyrG

HaeIII
232
AAGGAGAAGTTACACAAGAGCCTATTGCCAAGATGAGGGCGATGACCATCACTGGGCTAACGCTATTCCTCGATG
TTCCTCTTCAATGTGTTCTGGATAACGGTTCTACTCCCGCTACTGGTAGTGACCCGATTGCGATAAGGAGCTAC
lnGlyGluValThrGlnGluProIleAlaLysMetArgAlaMetThrIleThrGlyLeuThrLeuPheLeuAspV

HT 103 : T A: HT12/4 HT 17/1 : A
307
TGACGCTTGAGACATGGCGACAATACAGGGTGAGAGAAGACTTATCTGAGGTCGTTACGCGAGCAGAGCAAATCA
ACTGCGAACTCTGTACCGCTGTTATGTCCCACTCTCTTCTGAATAGACTCCAGCAATGCGCTCGTCTCGTTTAGT
alThrLeuGluThrTrpArgGlnTyrArgValArgGluAspLeuSerGluValValThrArgAlaGluGlnIleI
PheLys Asn

HT102/3: AA
HT13/4: T G: HT13/4
HaeIII 382
TCTACGACCAGAAATTCTCCGGCGCAGCCGATGATCTTCTCAACGCTAACATCATCGCCCGCGATTTGGGCGTCA
AGATGCTGGTCTTTAAGAGGCCGCGTCGGCTACTAGAAGAGTTGCGATTGTAGTAGCCGGGCGCTAAACCCGCAGT
leTyrAspGlnLysPheSerGlyAlaAlaAspAspLeuLeuAsnAlaAsnIleIleAlaArgAspLeuGlyLeuL
HT 13/4:Val Gly
HT 102/3:Glu

S-D 457
AAGAGCAGTCGCAATTTGAAGACGTGACACCTGATAAGGGAGATCGCGATAAGCGACGCTCTCGTATCAAGGAGC
TTCTCGTCAGCGTTAAACTTCTGCACTGTGGACTATTCCCTCTAGCGCTATTCGCTGCGAGAGCATAGTTCCTCG
ysGluGlnSerGlnPheGluAspValThrProAspLysGlyAspArgAspLysArgArgSerArgIleLysGluL

TaqI
532
ATTCAACCGTGGAACTGGACGCGATTCTTGATAACCTGAGCGACGAAGAGCAAATCGAATTGCTCGAGCTACTC
TAAGTTGGCACCTTGACCTGCGCTAAGAACTATTGGACTCGCTGCTTCTCGTTTAGCTTAACGAGCTCGATGAG
uPheAsnArgGlyThrGlyArgAspSerTER

gp2 ValGluLeuAspAlaIleLeuAspAsnLeuSerAspGluGluGlnIleGluLeuLeuGluLeuLeu

607
GAAGAAGAAGAGAACTACCGAAATACACACTTGCTATATGAGTTTACGCCATACAGCAAACAGCGTGAGTTCATC
CTTCTTCTTCTCTTGATGGCTTTATGTGTGAACGATATACTCAAATGCGGTATGTCGTTTGTCGCACTCAAGTAG
GluGluGluGluAsnTyrArgAsnThrHisLeuLeuTyrGluPheThrProTyrSerLysGlnArgGluPheIle

682
GACGCAGGTCATGATTATCAGAGCGATGTTTTATGGGTGGTAACCAGCTTGGTAAGTCATTTACTGGCGCTGCTG
CTGCGTCCAGTACTAATAGTCTCGCTACAAAATACCGACCATTGGTCGAACCATTCAGTAAATGACCGCGACGAC
AspAlaGlyHisAspTyrGlnSerAspValLeuTrpLeuValThrSerLeuValSerHisLeuLeuAlaLeuLeu

757
AAGTCGCGTTTCACCTTACCGGGCGATACCCGGGAACGAAAGGTTATCCGGCTGATGGTAAATATGGCGGAGAGT
TTCAGCGCAAAGTGGAATGGCCCGCTATGGGCCCTTGCTTTCCAATAGGCCGACTACCATTTATACCGCCTCTCA
LysSerArgPheThrLeuProGlyAspThrArgGluArgLysValIleArgLeuMetValAsnMetAlaGluSer

832
GGAAAGGTAAGCGTTTCTATGAGCCAGTTGTCTTCTGGGATTGGCGGTGAAACAAACGAGACTGTAACCAAAACG
CCTTTCCATTCGCAAAGATACTCGGTCAACAGAAGACCCTAACCGCCACTTTGTTTGCTCTGACATTGGTTTTGC
GlyLysValSerValMetSerGlnLeuSerSerGlyIleGlyGlyGluThrAsnGluThrValValThrLysThr

907
ACTCAACGCATCCTGTGCGGGCGTATCGAAGAGAATGATGAACCTGGCTATGGGTCACCGAAAGAGGACAGTAGC
TGAGTTGCGTAGGACACGCCCGCATAGCTTCTCTTACTACTTGGACCGATACCCAGTGGCTTTCTCCTGTCATCG
ThrGlnArgIleLeuCysGlyArgIleGluGluAsnAspGluProGlyTyrGlySerProLysGluAspSerSer

982
TGGGAGAAGTCTTCCGTTCTCCTAATCTTGTTGATCATCTTCTCGTTAAGCCATCATAGGCTGATGGTGTTGAAG
ACCCTCTTCAGAAGGCAAGAGGATTAGAACAACTAGTAGAAGAGCAATTCGGTAGTATCCGACTACCACAACTTC
TrpGluLysSerSerValLeuLeuIleLeuLeuIleIlePheSerLeuSerHisHisArgLeuMetValLeuLys

1057
ATGCATTCAATCTGCTACTTCAAGCATACTCGCAGGCATAGGCACGCAGCAGGTGACACAATCACGGCATATGGT
TACGTAAGTTAGACGATGAAGTTCGTATGAGCGTCCGTATCCGTGCGTCGTCCACTGTGTTAGTGCCGTATACCA
MetHisSerIleCysTyrPheLysHisThrArgArgHisArgHisAlaAlaGlyAspThrIleThrAlaTyrGly

1132
TTGACGAAGAGACTACCATACAGCATTTATGCCGAAGGTCTTACCCGTACAAACAAATACGGGCAATTCTCAATT
AACTGCTTCTCTGATGGTATGTCGTAAATACGGCTTCCAGAATGGGCATGTTTGTTTATGCCCGTTAAGAGTTAA
LeuThrLysArgLeuProTyrSerIleTyrAlaGluGlyLeuThrArgThrAsnLysTyrGlyGlnPheSerIle

1207
CTAACGTTTACCCCGCTGATGGGGATGTCTGACGGTGTTACCAAGTTCCTGAAGAATCCCAGCAAGTCGCAGAAA
GATTGCAAATGGGGCGACTACCCCTACAGACTGCCACAATGGTTCAAGGACTTCTTAGGGTCGTTCAGCGTCTTT
LeuThrPheThrProLeuMetGlyMetSerAspGlyValThrLysPheLeuLysAsnProSerLysSerGlnLys

1282
GTGGTCAACATGACCATCTATGACGCTGAGCACTACACCGACGAGCAGAAAGAGCAAATCATCGCATCCTATCCT
CACCAGTTGTACTGGTAGATACTGCGACTCGTGATGTGGCTGCTCGTCTTTCTCGTTTAGTAGCGTAGGATAGGA
ValValAsnMetThrIleTyrAspAlaGluHisTyrThrAspGluGlnLysGluGlnIleIleAlaSerTyrPro

1357
GAGCATGAGAGAGAGGCGCGTGCTCGCGGTATTCCTACGATGGGTAGCGGTCGAATATTCCAGATACCGGAAGAG
CTCGTACTCTCTCTCCGCGCACGAGCGCCATAAGGATGCTACCCATCGCCAGCTTATAAGGTCTATGGCCTTCTC
GluHisGluArgGluAlaArgAlaArgGlyIleProThrMetGlySerGlyArgIlePheGlnIleProGluGlu

1432
ACGATTAAGTGCCAGCCATTCGAATGCCCGGATCACTTCTATGTTATCGACGCTCAGGACTTCGGCTGGAACCAC
TGCTAATTCACGGTCGGTAAGCTTACGGGCCTAGTGAAGATACAATAGCTGCGAGTCCTGAAGCCGACCTTGGTG
ThrIleLysCysGlnProPheGluCysProAspHisPheTyrValIleAspAlaGlnAspPheGlyTrpAsnHis

1507
CCGCAAGCTCACATTCAGCTTTGGTGGGACAAAGACGCAGATGTTTTGTATCTGGCGCGTGTGTGGAAGAAATCA
GGCGTTCGAGTGTAAGTCGAAACCACCCTGTTTCTGCGTCTACAAAAGATAGACCGCGCACACACCTTCTTTAGT
ProGlnAlaHisIleGlnLeuTrpTrpAspLysAspAlaAspValPheTyrLeuAlaArgValTrpLysLysSer

1582
GAGAACACCGCAGTTCAGGCATGGGGTGCTGTTAAGTCGTGGGCTAACAAAATACCTGTCGCGTGGCCTCATGAC
CTCTTGTGGCGTCAAGTCCGTACCCCACGACAATTCAGCACCCGATTGTTTTATGGACAGCGCACCGGAGTACTG
GluAsnThrAlaValGlnAlaTrpGlyAlaValSerLysTrpAlaAsnLysIleProValAlaTrpProHisAsp

1657
GGTCACCAACACGAAAAGGGCGGTGGTGAGCAACTTAAAACCCAATATGCGGATGCCGGGTTCTCTATGCTTCCC
CCAGTGGTTGTGCTTTTCCCGCCACCACTCGTTGAATTTTGGGTTATACGCCTACGGCCCAAGAGATACGAAGGG
GlyHisGlnHisGluLysGlyGlyGlyGluGlnLeuLysThrGlnTyrAlaAspAlaGlyPheSerMetLeuPro

P22 Terminationsklon 5RC
1732
GATCACGCAACGTTCCCGGATGGCGGTAACTCAGTAGAGTCAGGCATTAGTGAGCTTCGTGACCTGATGCTTGAA
CTAGTGCGTTGCAAGGGCCTACCGCCATTGAGTCATCTCAGTCCGTAATCACTCGAAGCACTGGACTACGAACTT
AspHisAlaThrPheProAspGlyGlyAsnSerValGluSerGlyIleSerGluLeuArgAspLeuMetLeuGlu

1807
GGAAGATTCAAAGTATTCAACACATGCGAACCATTCTTTGAAGAGTTCCGCCTCTATCATCGCGACGAGAACGGC
CCTTCTAAGTTTCATAAGTTGTGTACGCTTGGTAAGAAACTTCTCAAGGCGGAGATAGTAGCGCTGCTCTTGCCG
GlyArgPheLysValPheAsnThrCysGluProPhePheGluGluPheArgLeuTyrHisArgAspGluAsnGly

1882
AAGATCGTCAAGACCAACGATGATGTGCTCGATGCTACTCGCTACGGCTACATGATGCGCCTTCGCCAGGATGAT
TTCTAGCAGTTCTGGTTGCTACTACACGAGCTACGATGAGCGATGCCGATGTACTACGCGGAAGCGGTCCTACTA
LysIleValLysThrAsnAspAspValLeuAspAlaThrArgTyrGlyTyrMetMetArgLeuArgGlnAspAsp

GCGCGATATC
CGCGCTATAG
AlaArgTyr

Fig. 8. Sequenz des EcoRV-Fragmentes von LP7 mit den kodierenden Sequenzen der Gene 3 und 2 (5' --> 3'). Durch Striche oberhalb der kodierenden Sequenz sind die bei der entsprechenden Sequenz von P22 abweichenden Basen markiert, mögliche Palindrome durch Pfeile zwischen den Strängen. Unterhalb der DNA-Sequenz stehen die aus der Primärsequenz abgeleiteten Aminosäurefolgen von gp3(LP7), gp2(LP7) und "gpORF1"(LP7). An den entsprechenden Stellen sind die Mutationsorte der sequenzierten P22 HT-Mutanten (vergl. 7.4.3) und die TaqI-Stellen, die zur Gewinnung des betreffenden Bruchstückes benutzt wurden, angegeben. In der Sequenz von Gen 2 ist die Ausdehnung eines sequenzierten "Terminationsklones" von P22 markiert, der aus dem Gen 2 von P22 stammt.

Im Verlauf der Sequenzanalyse stellte sich heraus, daß bei dem als Gen 2 (LP7) bezeichneten Leserahmen bis zum Ende des EcoRV-Fragmentes kein Stoppkodon auftaucht. Auch das errechnete Molekulargewicht von etwa 56 kD bis zur EcoRV-Stelle (siehe Fig. 8) ist kleiner als die aus früheren SDS-PAA-Gelen (Youderian und Susskind, 1980) bei P22 ermittelte Größe (67 kD).

7.4.2 Bestimmung der DNA-Sequenz von pGM4004

Eine weitere Sequenzanalyse wurde an einem Teil des Fragmentes PstI-D1 von LP7 vorgenommen. Im erf recA Transduktionstest erwiesen sich neben PstI-C noch die beiden PstI-Fragmente D1 und D2 als hochtransduzierbar, was dafür spricht, daß auch diese Fragmente eine Art pac site (Schmidt und Schmieger, 1984) enthalten. Nach einer Subklonierung von TaqI-Fragmenten von PstI-D1 in mit AccI gespaltenen pUC8 wurde wiederum ein Fragment (etwa 400 bp lang; pGM4004) gefunden, das transduziert wurde (siehe Fig. 2 und Tab. 6).

Zur Sequenzierung wurde dieses Fragment durch Spaltung mit HindIII und EcoRI präparativ aus pGM4004 gewonnen und in M13mp18 und M13mp19, die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten waren, kloniert (eine EcoRI-Spaltstelle unmittelbar neben einer der beiden TaqI-Stellen wurde offenbar weniger gut von der Endonuklease erkannt, so daß das präparativ gewonnene EcoRI-HindIII-Fragment diese zweite EcoRI-Stelle mit enthielt). Von den M13-Klonen wurde Template-DNA präpariert und zur Sequenzierung eingesetzt. Außerdem wurde das TaqI-Fragment aus pGM4004 präparativ mit den Enzymen Sau3A und HhaI gespalten. Diese Sau3A- resp. HhaI-Fragmente wurden isoliert und für eine Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1980) eingesetzt, deren Ergebnisse mit der später durch die Didesoxynukleotidmethode erhaltenen Sequenz übereinstimmen. In Fig. 7b sind die bei beiden Methoden eingeschlagenen Strategien der Sequenzierung vereinigt dargestellt. Die erhaltene Sequenz und einige auffallende potentielle Sekundärstrukturen, die in dem unterhalb der DNA-Sequenz abgebildeten Matrixvergleich als auffällige Flecken zu erkennen sind, werden in der Fig. 9 gezeigt. In dem Matrixvergleich wurde die Sequenz von pGM4004 mit

pGM1000 verglichen, wobei homologe Abschnitte hervortreten.

Fig. 9. DNA-Sequenz von pGM4004 und Purin/Pyrimidin-Punktmatrixvergleich. (Umrandete Abschnitte: vergl. Fig. 16)

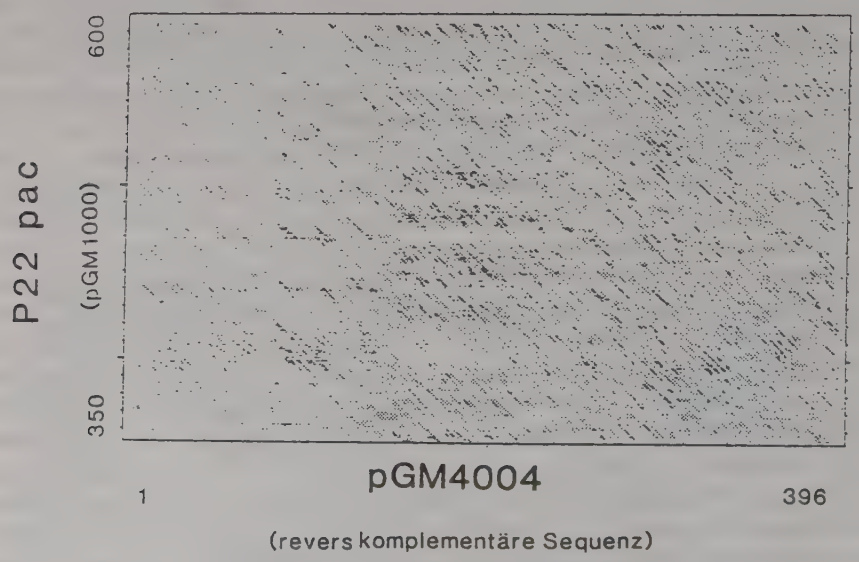
```
TaqI
        10        20        30        40        50        60        70        80
TCGATGCGTAACTGCTGAATTCTCGCCTCGTGGTCTGCAAGCTCAACATCCTGCTCATCGTTCTTCACCTGCGCGTCATA
AGCTACGCATTGACGACTTAAGAGCGGAGCACCAGACGTTCGAGTTGTAGGACGAGTAGCAAGAAGTGGACGCGCAGTAT

        90       100       110       120       130       140       150       160
GGCACCTTTTCCTGCTTCGTTTGCCTTTCCTGCAATAGCGCCAACGTCATCCCCTGCGCGCGATTACGTAGAGCAGATAC
CCGTGGAAAAGGACGAAGCAAACGGAAAGGACGTTATCGCGGTTGCAGTAGGGGACGCGCGCTAATGCATCTCGTCTATC

       170       180       190       200       210       220       230  I    240
GACCGGCTGAAGAGTTGCGGGGCGAGGATTGAGGCATCAAGACGGGTGGCCTGAATAATGACAGGATTATTAAGTGACGC
CTGGCCGACTTCTCAACGCCCCGCTCCTAACTCCGTAGTTCTGCCCACCGGACTTATTACTGTCCTAATAATTCACTGCC

       250  II   260       270       280       290       300       310       320
ATCTGCCATATTTTACTCCAGACGAATTGACACCCGGATATTGTTACTGGTTGAATTTGTGATTACACGCAGTTTAATCC
TAGACGGTATAAAATGAGGTCTGCTTAACTGTGGGCCTATAACAATGACCAACTTAAACACTAATGTGCGTCAAATTAGG

       330       340       350       360       370       380       390  TaqI 400
GATTAATCGACAGCGTTGCGCAGTACGTGACCGCCTGTTCCTGTCTGCAACCACAGACGGAATCAACTATGGTCGA
CTAATTAGCTGTCGCAACGCGTCATGCACTGGCGGACAAGGACAGACGTTGGTGTCTGCCTTAGTTGATACCAGCT
```



Weder mit Gen 3 (LP7) noch mit Gen 3 (P22) wurde eine längere Sequenzhomologie gefunden, die signifikant ist. Allerdings lassen sich mit einer verfeinerten Computeranalyse, die als Kriterium beispielsweise eine Übereinstimmung von Purin/Purin- bzw. Pyrimidin/Pyrimidinbasen berücksichtigt, doch mögliche gemeinsame Strukturmerkmale aus- machen (siehe Diskussion).

7.4.3 Bestimmung der Mutationsorte von P22 HT-Mutanten

Für das Studium eines veränderten Verhaltens von Phagen bei der Initiation der DNA-Verpackung bietet sich noch ein direkter Weg an. Während es sich bei LP7 nur um einen mit mit P22 mehr oder minder nahe verwandten Phagen handelt, der jedoch in etlichen weiteren Kriterien von P22 verschieden ist, bieten P22 HT-Mutanten (Schmieger, 1971, 1972; vergl. Einführung) die Möglichkeit, Phagen zu betrachten, die sich ausschließlich in der Verpackungs- und Transduktionsspezifität vom Wildtyp unterscheiden. Deshalb erschien es als sinnvoll, die Sequenzen der Gene 3 einiger HT-Mutanten in den Vergleich mit einzubeziehen (Vergleich aller betrachteter Gen 3 Sequenzen: Fig. 10).

Während der Arbeit wurde mir die Sequenz des Genes 3 der P22-Mutanten HT13/4 und HT12/4 zugänglich (S. Casjens, persönliche Mitteilung). Beide Mutanten sind dadurch charakterisiert, daß sie in ihrer Verpackungsspezifität deutlich reduziert sind und bakterielle Marker mit erheblich höherer Häufigkeit transduzieren als der Wildtyp (Schmieger, 1972). Die Sequenz des Genes 3 der Mutante HT13/4 weist zwei Basenaustausche und als Konsequenz zwei geänderte Kodons gegenüber der Sequenz von H5 auf: LP7 Pos. bp 336: C-->T: Pos. aa 112: Ala-->Val; Pos. bp 342: A-->G: Pos. aa 114: Asp-->Gly. Die Positionen der Mutationsorte von HT12/4, HT13/4 und HT103/2 sowie der weiter unten folgenden HT-Mutanten sind in Fig. 8 in der Sequenz von LP7 angegeben. Die Zählung bei LP7 stimmt allerdings wegen des unterschiedlichen Startpunktes der Sequenzierung nicht mit der für P22 publizierten überein. Da die Position "des" pac Schnittes nicht in der gleichen Weise wie bei der cos site von Lambda definiert ist, müßte man sich auf eine andere Position einigen. Unseres Erachtens eignet sich das erste

Nukleotid in der kodierenden Sequenz von Gen 3 am besten als Position 1. Die von Backhaus (1984, 1985) als Position 1 gewählte DdeI-Schnittstelle ist a) relativ willkürlich und b) in LP7 nicht vorhanden. Daher folgt in dieser Arbeit die Numerierung der Sequenz dem oben vorgeschlagenen Muster.

Unter den von Schmieger (1972) gefundenen HT-Mutanten erwies sich HT12/4 als diejenige, deren biologisches Verhalten am meisten verändert war. Analysen der EcoRI-Restriktionsmuster zeigen, daß bei HT12/4 - anders als bei allen übrigen untersuchten HT-Mutanten - die (unterrepräsentierte) Bande EcoRI-D nicht vorkommt (siehe auch Jackson et al., 1982). Bei starker Überladung des Agarosegels konnte E. Jackson jedoch zwei neue (unterrepräsentierte) Banden unterhalb der EcoRI-Banden A und C entdecken. Durch Hybridisierung von radioaktiv markierter pGM1000-DNA gegen die EcoRI-Banden von P22H5- und HT12/4-DNA konnte ich zeigen, daß selbst in einem sehr empfindlichen Testsystem keine noch so kleine Menge an EcoRI-Fragment D bei HT12/4 nachgewiesen werden kann. Die beiden neuen unterrepräsentierten Banden hybridisieren nicht mit pGM1000-DNA. Die Sequenzierung des Genes 3 von HT12/4 durch Casjens ergab, daß sich Wildtyp und HT12/4 nur in einer Base (LP7: Pos. bp 241: G-->A) unterscheiden, was in der Proteinsequenz eine in der Ladung relativ drastische Änderung von Glu-->Lys (Pos. 81) bewirkt.

Nachdem diese Änderungen gerade in dem interessanten Bereich des Genes 3 liegen, der auch - wie noch in der Diskussion ausführlich zu erörtern sein wird - aufgrund anderer Befunde besonders für die Suche nach der pac site in Frage kommt, lag es nahe, selbst noch weitere HT-Mutanten von P22 zum Vergleich heranzuziehen. Dafür wurde zunächst die Mutante HT103/2 ausgewählt, weil sie ebenfalls durch eine relativ drastische Erhöhung der Transduktionsraten charakterisiert ist. Von deren DNA wurde das TaqI-Fragment, welches den fraglichen Bereich (P22: bp Pos. 435 bis 840; entspricht LP7: bp Pos. 117 bis 522) überspannt, präpariert und in mit AccI gespaltenen pUC8 in beiden Orientierungen kloniert. Die Orientierung läßt sich leicht durch die relative Lage eines in dem TaqI-Fragment asymmetrisch gelegenen NruI-Schnittes (LP7: Pos. 426) oder Sau96I-Schnittes (Pos. 375) feststellen (vergl. die Übersicht über die neukonstru-

ierten Plasmide; Fig. 2). Die erhaltenen Plasmide (pGM4009 und pGM4010) wurden zunächst im erf recA Transduktionstest eingesetzt, um nachzuweisen, daß das biologisch relevante Signal tatsächlich vorhanden ist. Beide Plasmide wurden etwa gleich gut transduziert (Tab. 6). Anschließend wurde mit den gleichen Plasmiden die DNA-Sequenz dieses Abschnittes ermittelt (Strategie: Fig. 7c) und mit der Wildtyp-Sequenz verglichen. Ebenso wie die Mutante HT12/4 weist HT103/2 (jedenfalls in dem sequenzierten TaqI- Fragment) nur eine einzige Transition (Pos. 238: C-->T) gegenüber dem Wildtyp auf. Dies führt in der Proteinsequenz zu einem Aminosäureaustausch an Pos. 80: Leu-->Phe.

Als sich durch dieses Experiment gezeigt hatte, daß die spezifische Betrachtung (genauer: Sequenzierung) des Haupt-TaqI-Fragmentes, welches 128 von 163 Kodons aus der Sequenz von Gen 3 abdeckt, erfolgreich zur Bestimmung des Ortes einer Mutation in diesem Gen bei HT-Phagen eingesetzt werden konnte, wurden in analoger Weise die entsprechenden TaqI-Fragmente aus den P22 HT-Phagen HT102/3 und HT17/1 gewonnen, in die AccI-Stelle von pUC19 kloniert und sequenziert.

Die Sequenzanalyse des TaqI-Fragmentes von HT102/3 ergab, daß die Mutante in dem überprüften Abschnitt zwei Basenaustausche aufweist (LP7 Pos. 336 und 337; C-->A), die eine geänderte Aminosäuresequenz bedingen (Pos. 112: Ala--> Glu).

HT17/1 fällt als einzige der in dieser Arbeit untersuchten HT-Mutanten aus dem Rahmen, weil nach der Sequenzanalyse der Mutationsort zu keinem der bei den übrigen HT-Phagen gefundenen beiden Bereiche um Aminosäure 80 bzw. Aminosäure 113 gehört, sondern dazwischen liegt (LP7: Pos. 271: G-->A). Diese Mutation führt in der Aminosäuresequenz zu einem Austausch in Pos. 91 (Asp --> Asn). Bemerkenswerterweise bedingt auch diese Mutation eine Änderung der Ladung des Proteins.

Von S. Casjens (persönl. Mitteilung) bestimmte Mutationsorte von fünf weiteren HT-Mutanten liegen in demselben Bereich wie der von HT17/1. Dies könnte bedeuten, daß es sich dabei um einen dritten kritischen Bereich innerhalb des Proteins handelt. Bei diesem Bereich ist allerdings die Situation insofern etwas verschieden von den anderen beiden,

als dieser Abschnitt außerdem derjenige ist, der auf der DNA-Ebene als pac Signal in Frage kommt (siehe Diskssion, Fig. 16).

7.5 Homologievergleiche und computergestützte Analyse der gefundenen Sequenzdaten

In der Fig. 10 sind die sieben bekannten (abgeleiteten) Aminosäuresequenzen der Genprodukte 3 von P22, LP7, HT13/4, HT12/4, HT103/2, HT102/3 und HT17/1 zum Vergleich untereinander geschrieben. Die sehr starke Homologie zwischen gp3(LP7) und gp3(P22) ist daraus unmittelbar ersichtlich. In Zahlen ausgedrückt beträgt der Homologiegrad auf der DNA-Ebene 92.2 % und auf der Ebene der Aminosäuren sogar 95.7 %. Bei zwei Aminosäuren (Arginin an Pos. 65 und 87) unterscheiden sich die Kodons in jeweils zwei Basen; trotzdem ist die Aminosäuresequenz an diesen Stellen vollständig gleich bei P22 und LP7.

Über den Homologiegrad zwischen gp2(LP7) und gp2(P22) läßt sich weit weniger aussagen, weil von Gen 2 (P22) nur kurze DNA-Bereiche aus vorläufigen Exerimenten (K. Mansouri und S. Schießl, persönliche Mitteilung) bekannt sind. Ein Teil der Sequenz des Genes 2 (P22) zeigt über eine Strecke von 109 bp eine perfekte Homologie zu Gen 2 (LP7) im Bereich von Pos. 1849 bis 1958.

Über die Genprodukte 3 und 2 liegen nur vereinzelte Daten aus proteinchemischen Untersuchungen vor. Es gibt jedoch Algorithmen, mit deren Hilfe man Vorhersagen über die wahrscheinliche Struktur (globulärer) Proteine aufgrund der Primärsequenz gemacht werden können (Chou und Fasman, 1974; Garnier et al., 1978; Kyte und Doolittle, 1982), die dann (vorsichtig) interpretiert werden können.

Solche Vorhersagen wurden über fünf gp3-Sequenzen gemacht (mit Hilfe von Dr. Susanne Modrow, Max-von-Pettenkofer Institut, München) und miteinander verglichen (Fig. 11; siehe Diskussion). Die "Hydrophilizität" von Proteinen läßt sich aus der Aminosäurefolge berechnen, graphisch darstellen und zur vorsichtigen Beurteilung von Proteinen

oder Proteinbereichen heranziehen. Solche Hydrophilizitätsgraphen der sieben Genprodukte 3 wurden mit dem Programm von Messing erstellt (Fig. 12) und miteinander verglichen. Die dabei gefundenen Unterschiede sind in den Abbildungen markiert. Die Unterschiede im Hydrophilizitätsmuster zwischen den verglichenen Aminosäuresequenzen sind naturgemäß nicht besonders auffällig, da auch die Primärsequenzen sich nur geringfügig unterscheiden. Immerhin lassen sich Unterschiede ausmachen, die als ausschlaggebend für veränderte biologische Eigenschaften diskutiert werden können (siehe Diskussion der Ergebnisse).

Auch die Aminosäuresequenz des Genproduktes 2(LP7) (Fig. 8) wurde als Hydrophilizitätsgraph dargestellt und mit demjenigen des analogen A-Genproduktes von Lambda verglichen (Fig. 13).

20

ATG GCG GCA CCA AAG GGC AAC CGA TTT TGG GAG GCC CGC AGT AGT CAT GGG CGA AAT CCT
MET Ala Ala Pro Lys Gly Asn Arg Phe Trp Glu Ala Arg Ser Ser His Gly Arg Asn Pro

40

AAA TTC GAA TCG CCT GAG GCG CTG TGG GCT GCT TGT TGT GAA TAC TTC GAG TGG GTG GAA
Lys Phe Glu Ser Pro Glu Ala Leu Trp Ala Ala Cys Cys Glu Tyr Phe Glu Trp Val Glu

60

GCT AAC CCG CTA TGG GAG ATG AAG GCG TTC TCG TAT CAG GGT GAA GTG ATA CAA GAG CCT
Ala Asn Pro Leu Trp Glu Met Lys Ala Phe Ser Tyr Gln Gly Glu Val Ile Gln Glu Pro
Thr

80

ATC GCC AAG ATG CGA GCG ATG ACC ATT ACT GGC CTC ACT CTG TTC ATT GAT GTG ACG CTT
Ile Ala Lys Met Arg Ala Met Thr Ile Thr Gly Leu Thr Leu Phe Ile Asp Val Thr Leu
Leu
Phe

100

GAA ACA TGG CGC ACA TAT CGC CTG AGA GAA GAT TTA TCT GAA GTC GTT ACG CGA GCA GAA
Glu Thr Trp Arg Thr Tyr Arg Leu Arg Glu Asp Leu Ser Glu Val Val Thr Arg Ala Glu
Gln Val
Lys
Asn

120

CAG GTC ATC TAC GAC CAG AAA TTC TCT GGC GCA GCC GCT GAC CTT CTC AAC GCT AAC ATC
Gln Val Ile Tyr Asp Gln Lys Phe Ser Gly Ala Ala Ala Asp Leu Leu Asn Ala Asn Ile
Ile Asp
Val Gly
Glu

140

ATC GCC CGT GAT TTG GGC CTC AAA GAG CAG TCG CAA GTT GAA GAC GTG ACA CCT GAT AAG
Ile Ala Arg Asp Leu Gly Leu Lys Glu Gln Ser Gln Val Glu Asp Val Thr Pro Asp Lys
Phe

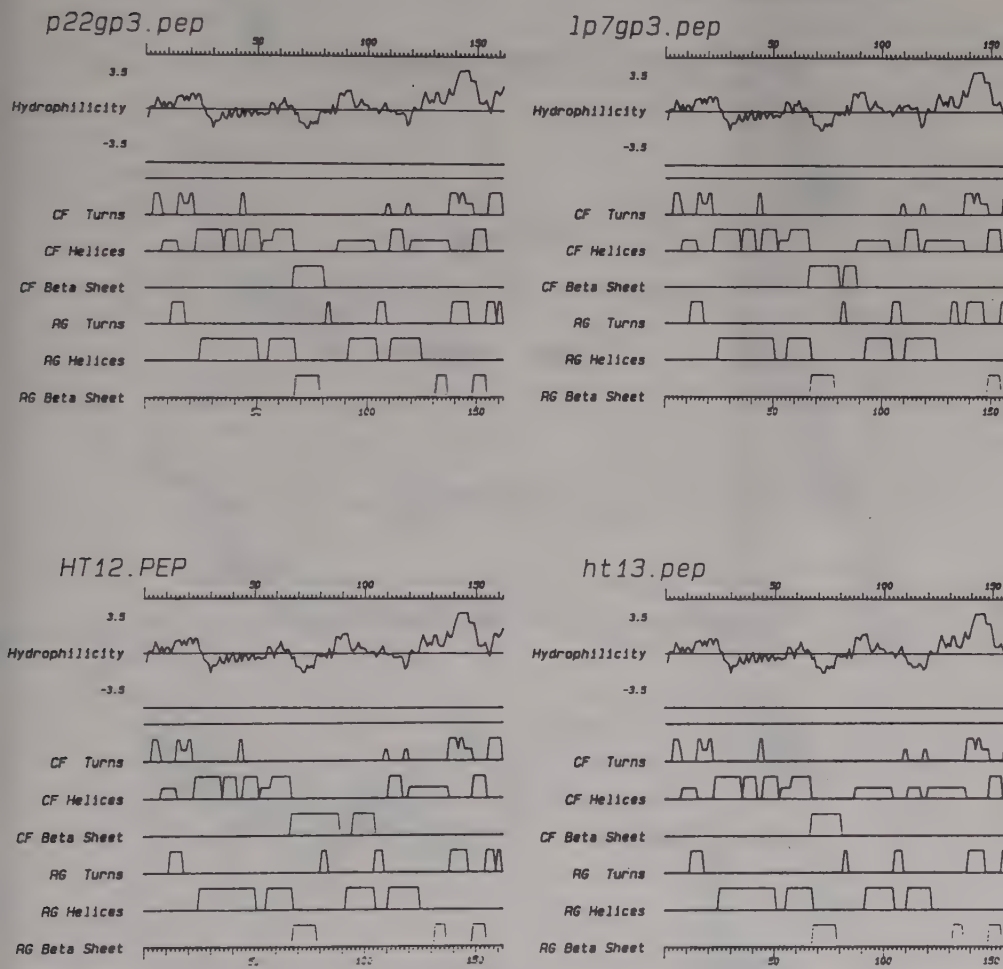
160

GGA GAT CGC GAT AAG CGA CGC TCT CGT ATC AAG GAG CTA TTC AAC CGT GGA ACT GGA CGC
Gly Asp Arg Asp Lys Arg Arg Ser Arg Ile Lys Glu Leu Phe Asn Arg Gly Thr Gly Arg

GAT TCT TGA
Asp Ser TER P22 gp3
TER LP7 gp3
TER HT 13/4 gp3
TER HT 12/4 gp3
TER HT103/2 gp3
TER HT102/3 gp3
TER HT 17/1 gp3

Fig. 10. Vergleich der Genprodukte 3 von P22, LP7 und fünf HT-Mutanten von P22
(•) gleiche Aminosäure wie bei P22
negativ geladene Aminosäure
positiv geladene Aminosäure

Fig. 11. **Sekundärstrukturvorhersagen für Genprodukt 3 von LP7, P22, HT12/4 und HT13/4** (nach den Algorithmen von Chou und Fasman, 1974 (=CF) bzw. Garnier et al., 1978 (=RG)).



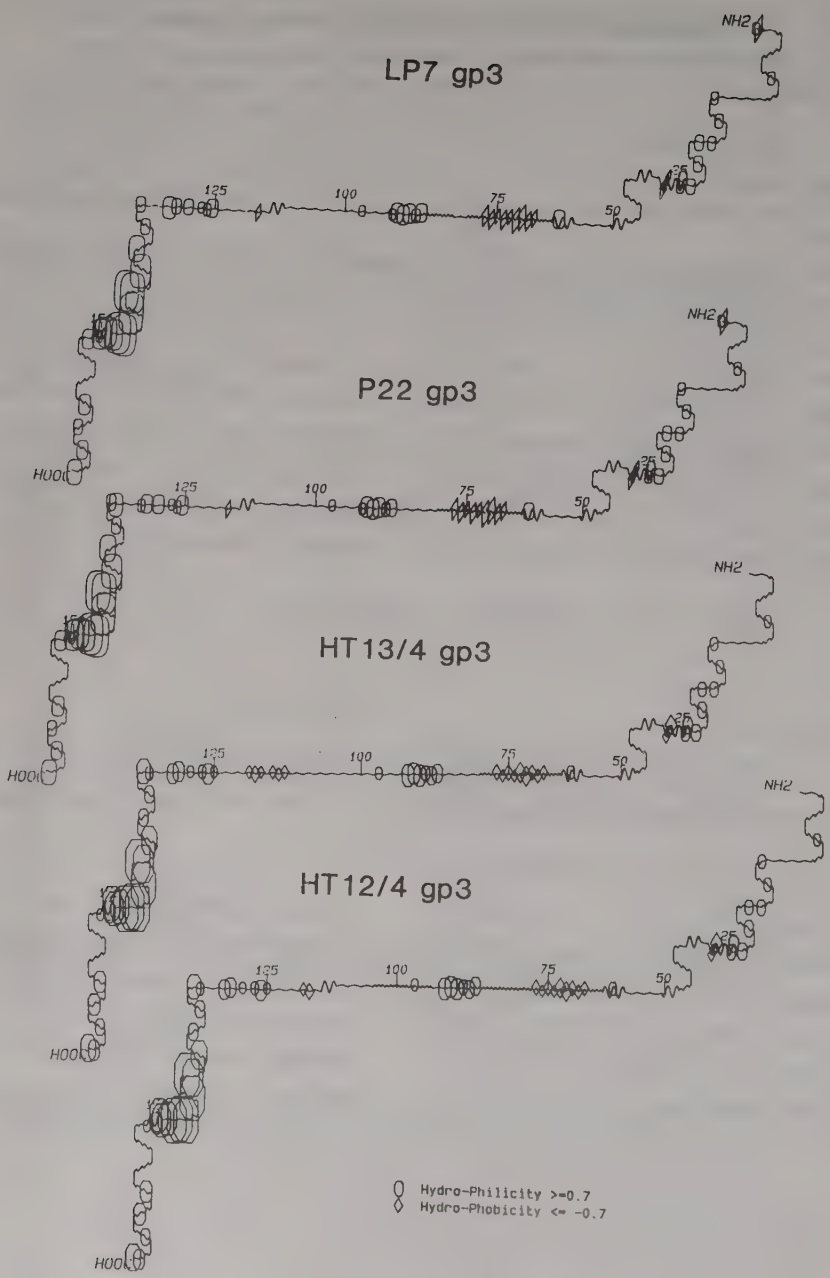
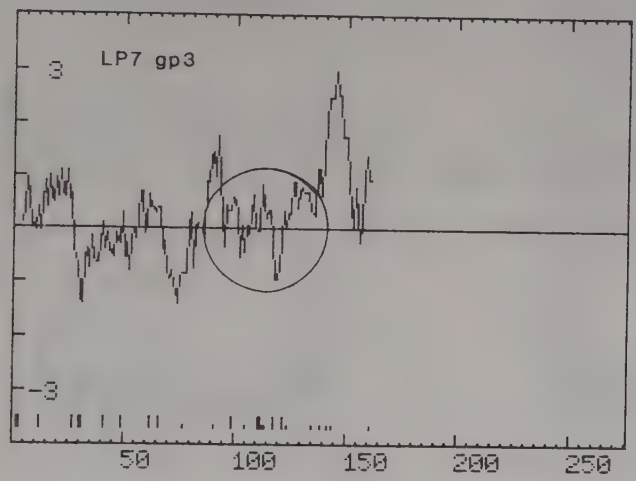
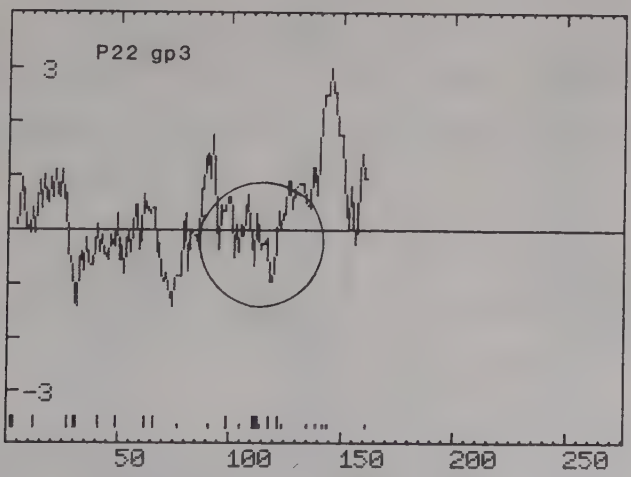
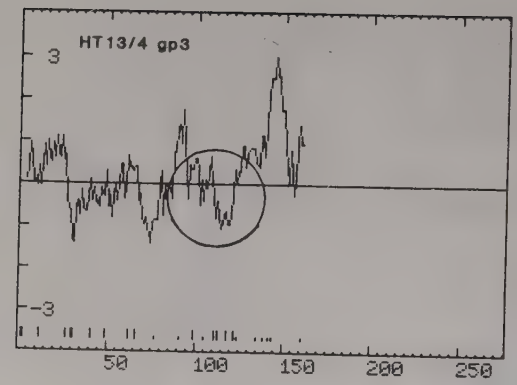
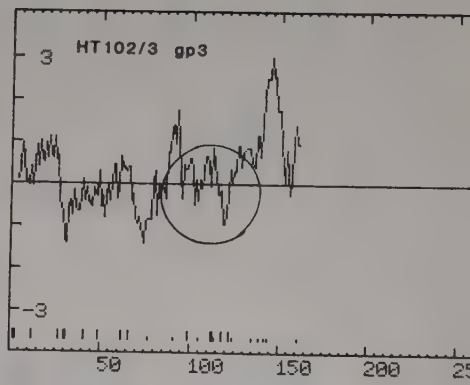

LP7 gp3
NH2
125
100
75
50
25
P22 gp3
NH2
HOOC
125
100
75
50
25
HT13/4 gp3
NH2
HOOC
125
100
75
50
25
HT12/4 gp3
NH2
HOOC
125
100
75
50
25
HOOC
Hydro-Philicity >=0.7
Hydro-Phobicity <= -0.7

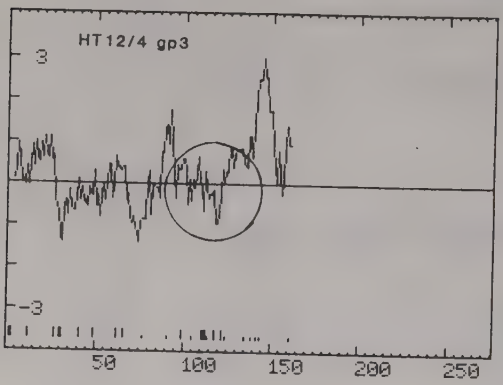
Fig. 12. **Vergleich der Hydrophilizitätsgraphen von verschiedenen gp3 und gpNu1(Lambda).** Die Hydrophilizitätswerte sind jeweils über sieben Aminosäuren berechnet. Markiert sind von P22 abweichende Werte und Positionen von ala (|) und asp (,).

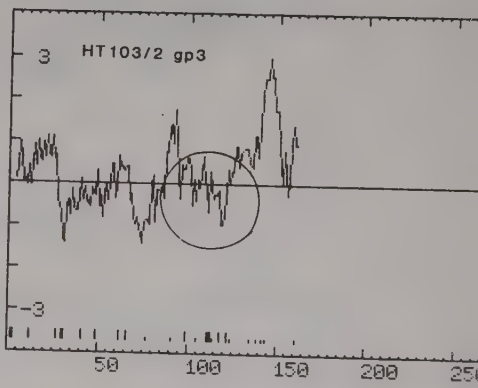


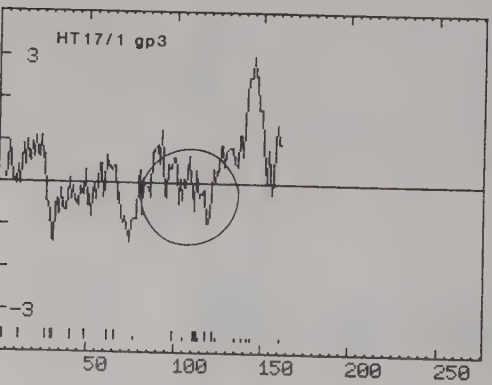



HT13/4 gp3
3
-3
50
100
150
200
250


HT102/3 gp3
3
-3
50
100
150
200


HT12/4 gp3
3
-3
50
100
150
200
250


HT103/2 gp3
3
-3
50
100
150
200


HT17/1 gp3
3
-3
50
100
150
200
250

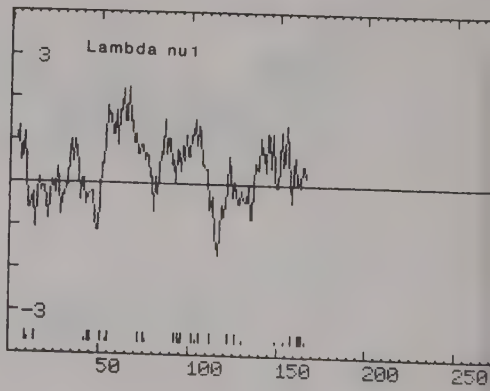
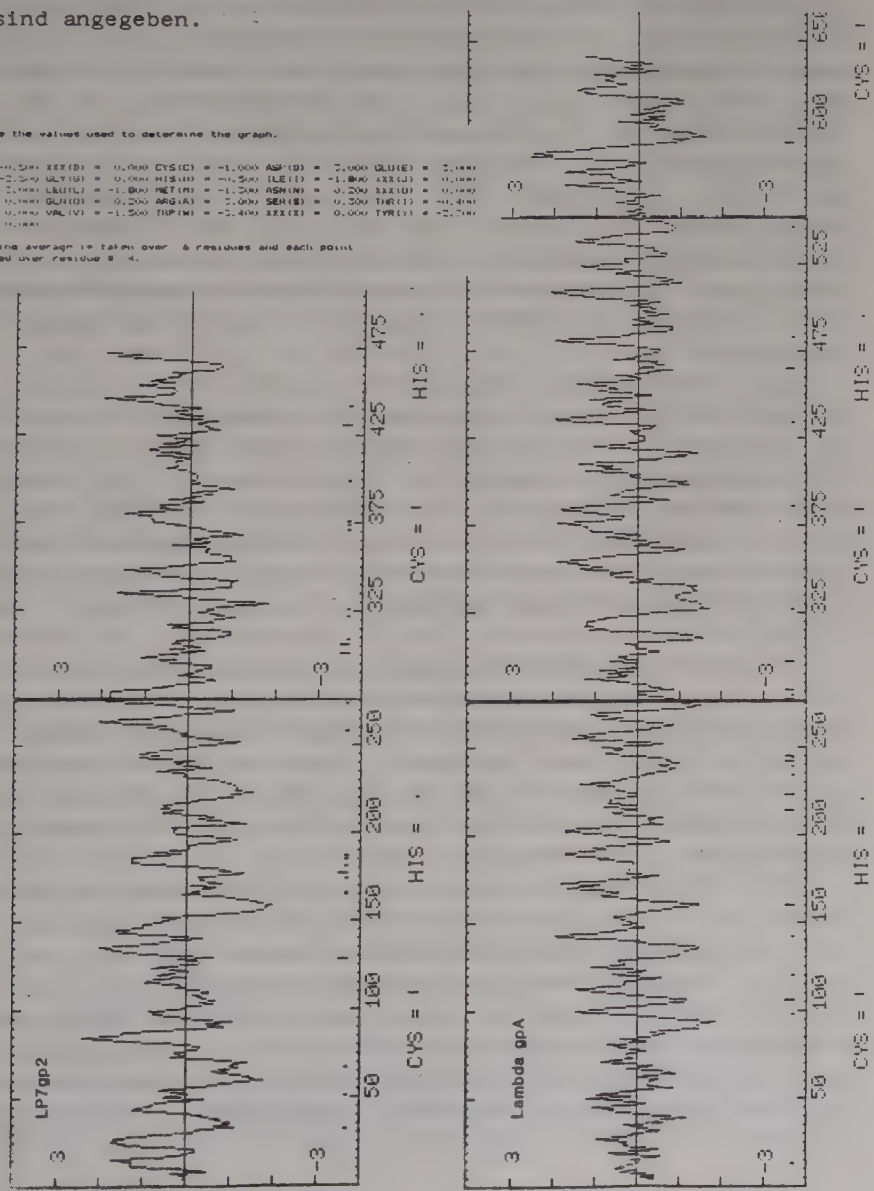

Lambda nu1
3
-3
50
100
150
200
250

Fig. 13. **Vergleich der Hydrophilizitätsgraphen von gp2(LP7) und gpA(Lambda).** Die Hydrophilizitätswerte sind jeweils über sechs Aminosäuren berechnet. Markiert sind cys (|) und his (ı). Die zugrundegelegten Werte der Aminosäuren sind angegeben.



8. Diskussion

8.1 Transduktion bakterieller Marker

Die weitgehend akzeptierte Modellvorstellung zur Entstehung transduzierender Partikel (Chelala und Margolin, 1974; Backhaus und Schmieger, 1976; Schmieger, 1982; Vogel und Schmieger, 1986) baut darauf auf, daß die Verpackung von bakterieller DNA an bevorzugten Stellen startet, die über das gesamte bakterielle Chromosom verstreut sind. Die Stellen ähneln dem pac Signal des jeweiligen Phagen mehr oder minder stark, was direkt die Häufigkeit des Verpackungsstarts an den bakteriellen Pseudosignalen beeinflußt. Auch für andere transduzierende Phagen wie Mu wurden in diesem Punkt vergleichbare Modelle aufgestellt (Teifel und Schmieger, 1981).

Auch bei den hier untersuchten Phagen treten die Abweichungen in der Spezifität gegenüber bakteriellen "Quasi" pac Signalen in den teilweise sehr unterschiedlichen Transduktionsfrequenzen zutage (Tab. 2), die um drei (bis vier) Zehnerpotenzen variieren. Als wesentlicher Unterschied ist dabei zu vermerken, daß die Transduktionswerte der geprüften Wildtyp-Phagen zwar stark variieren, sich aber insgesamt in derselben Größenordnung wie bei P22 bewegen (10^{-6} bis 10^{-8}).

Im Gegensatz dazu sind etwa die Transduktionsraten bei den (dadurch charakterisierten) HT-Mutanten von P22 zu sehen, die insgesamt wesentlich häufiger bakterielle DNA anstelle von Phagen-DNA verpacken. Auch bei den HT-Phagen wurden, wenn auch sehr geringe, marker-spezifische Häufigkeitsunterschiede beobachtet (etwa um den Faktor 10; Chelala und Margolin, 1976; Schmieger, 1982).

Die Betrachtung der Maxima und Minima bei den einzelnen Phagen zeigt, daß z.T. beträchtliche Unterschiede bestehen. Der üblicherweise besttransduzierte Marker bei P22 ist hisHB22 , wie auch an den vorgelegten Transduktionsfrequenzen von P22 zu sehen ist. Der ansonsten in allen geprüften Kriterien (DNA- und Proteinmuster) zu P22 sehr ähnliche und daher wenig auffällige Phage A2f transduziert diesen Marker hundertmal schlechter als P22, transduziert jedoch cysE

60mal und cysC zehnmal häufiger als P22.

LP7 zeigt im Transduktionsverhalten relativ geringe Unterschiede zu P22 (argE siebenmal weniger, cysC vierzehnmal weniger), was durchaus nicht in Widerspruch zu den Daten aus der DNA-Sequenzierung steht. Auch ES18h1 und KB1 zeigen im Transduktionsverhalten eher geringere Unterschiede zu P22 als etwa die A-Phagen.

8.2 Immunität

Aus den Versuchen zur Bestimmung der Kreuzimmunität sind einige Befunde herauszuheben, da sie Auskunft über das biologische Verhältnis der Phagen zueinander geben.

Der Prophage LP7 schließt das Wachstum sämtlicher anderer überprüfter Phagen mit Ausnahme von ES18h1 aus. Dies deutet in Analogie zu P22, der alle anderen überprüften Phagen gleichermaßen ausschließt, auf das Vorhandensein eines sie ähnlichen Systems bei LP7. Es ist auffällig, daß gerade ES18h1 nicht betroffen ist. Als Erklärung dafür liegt nahe, daß ES18h1 den Wirt an einem anderen Ort infiziert. ES18h1 ist als einziger der hier benutzten Phagen in der Lage, Rough-Mutanten von S.typhimurium zu infizieren, die dadurch von dem (normalen) Smooth-Typus abweichen, daß ihnen die äußerste Lipopolysaccharidschicht fehlt, die P22 erwiesenermaßen (Susskind und Botstein, 1978) erkennt.

Wenn das sie System räumlich in Verbindung steht mit dem normalen Anheftungsort (Susskind et al., 1971, 1974a: sieA erkennt heterologe und homologe Phagen-DNA bereits im periplasmatischen Raum), wäre erklärbar, daß ES18h1 wegen seines anderen Anheftungsortes und -modus an die Bakterienzelle dem sieA-analogen System von LP7 entkommt. Es wäre auch daran zu denken, daß ES18h1 (analog zu dem bei Susskind et al. (1974b) diskutierten Verhältnis zwischen P22 und L) ein esc_{ES18}-Allel besitzt, welches antagonistisch zu sieB, dem Ausschlußsystem, das nur gegen heterologe Phagen gerichtet ist, wirkt. Susskind et al. (1974b) weisen auf eine bemerkenswerte Ähnlichkeit (auch nach der Position auf der Genkarte) zwischen dem sieB-System und dem Ausschluß von T4rII-Mutanten durch Lambda-Prophagen (rex-System; Howard,

1967) oder dem Ausschluß von Lambda durch P2-Prophagen (old-System; Lindahl et al., 1970) hin.

An den Werten, die in Tab. 1 aufgeführt sind, ist weiterhin auffällig, daß die drei Phagen KB1, A1a und A2f außer bei Anwesenheit eines P22 sie -Prophagen nur noch bei der Anwesenheit eines ES18h1-Prophagen Vermehrung zeigen, während die übrigen Phagen zu allen anderen Phagen jeweils Heteroimmunität besitzen, wenn nicht (wie bei H1 oder LP7) ein Ausschlußsystem bereits die korrekte Injektion der DNA in den Wirt verhindert.

Das eigenartige Phänomen einer nicht-reziproken Heteroimmunität zwischen P22 und ES18h1 (Kuo und Stocker, 1970) konnte zwar mehrfach bestätigt, aber nicht hinreichend erklärt werden. Für eine Erklärung könnte man entweder an eine unterschiedlich starke Bindungsfähigkeit des jeweiligen Repressors an die DNA des heteroimmunen Phagen (P22-Repressor würde dann fester an die Immunitätsregion von ES18 binden als umgekehrt der Repressor von ES18 an P22) oder an das zweite Immunitätssystem (immI) von P22 denken.

Von vorneherein läßt sich nicht ausschließen, daß P22 noch ein (hypothetisches) sieC-System haben könnte, das mit den übrigen Phagen nicht geprüft werden kann, da es nur gegen Phagen wirkt, die den gleichen Adsorptionsort wie ES18 benutzen.

8.3 Marker-rescue-Experimente

In der hier gezeigten Vollständigkeit wurden marker-rescue-Experimente in der beschriebenen Weise noch nicht unternommen. Im Ergebnis kamen neben bekannter oder mindestens vermuteter Verwandtschaft zwischen Phagen wie P22 und L einige Überraschungen heraus.

Aufgrund von Heteroduplexanalysen mit den Genomen von L und P22 (Wiggins und Hilliker, 1985b) war die relativ hohe Homologie zwischen beiden Phagen bekannt (wenngleich z.B. Behandlung der DNA mit Restriktionsenzymen die Spaltmuster von P22 und L keine sehr starke Ähnlichkeit aufweisen; vergl. Fig. 4b). Auch die Tatsache, daß man leicht P22::L-Hybride in den verschiedensten Kombinationen erzeugen kann

(Kinkeldey, 1978; Hilliker, 1981), spricht für eine engere Verwandtschaft beider Phagen. Mit LP7 konnte das Experiment nicht durchgeführt werden, weil ein lysogener LP7 Wachstum von P22 ausschließt (siehe 7.1.2). Bei den drei weiteren Phagen vom Typ A (A1a, A2f, A3), die untersucht wurden, konnten jedoch mit nur geringen Abweichungen dieselben Werte wie bei L gemessen werden, was sehr stark dafür spricht, daß all diese Phagen sehr nahe miteinander verwandt sind. Alle geprüften Gene, die das gesamte P22-Genom abdeckten, konnten den P22 Amber-Phagen im Austausch zur Vermehrung verhelfen.

Aus den Beobachtungen läßt sich der Schluß ziehen, daß P22, L, A1a, A2f und A3 ursprünglich von einem einzigen Vorfahren herrühren und sich im Verlauf der Evolution nur punktuell (z.B. Immunität) vom Ursprung entfernt haben. Wie man aus den Transduktionsraten entnehmen kann, haben sich dabei z.T. trotzdem beträchtliche Unterschiede herausgebildet. Es gibt immerhin zwei nicht essentielle Genfunktionen, bei denen man Unterschiede selbst zwischen eng verwandten Phagen festgestellt hat. Beispielsweise ist von dem Phagen L bekannt (Hilliker und Botstein, 1976; Wiggins und Hilliker, 1985b), daß er keine zweite Immunitätsregion, die immI Region, wie etwa P22 besitzt. Außer bei LP7 deutet bei keinem anderen der oben genannten Phagen etwas darauf hin, daß er ein sie System analog zu dem von P22 besitzt.

Aufgrund der zuvor diskutierten Ergebnisse stellen diejenigen mit ES18h1 eine echte Überraschung dar. Nach den übrigen Befunden war nicht zu erwarten, daß gerade ES18h1 darüber hinaus soweit Gemeinsamkeiten mit P22 hat, daß aus einigen Genen von ES18h1 entsprechende Amber-Mutanten von P22 restauriert werden können. Die Gene, die defekte P22-Gene ersetzen können, stammen alle aus dem "frühen" Bereich" (Antitermination, Replikation, späte Kontrolle). Der Blick auf die Genkarte von P22 (Fig. 1a) zeigt, daß alle genannten Gene dicht beisammen liegen. Daher liegt - im Rückgriff auf die Modultheorie von Botstein (1980) - die Vermutung sehr nahe, daß die frühen Gene von ES18h1 irgendwann in der Evolution als Block (oder "Kassette") für diesen Funktionsteil eines Phagen übernommen wurden. Sämtliche späten Gene von ES18h1, also vorwiegend die Strukturgene für die Kopf- und Schwanzproteine, zeigen keinerlei Ersatzmöglichkeit für

"entsprechende" P22-Proteine. Bereits die äußere Form von ES18h1 zeigt starke Unterschiede in der Phagenmorphologie. Nach diesen Daten liegt die Behauptung, die allerdings durch entsprechende Untersuchungen noch nachzuweisen ist, nahe, daß ES18h1 ursprünglich als eine Art "natürliches" Hybrid zwischen einem Vertreter der Lambda- (äußere Form und Genomlänge) und der P22-Reihe (Fähigkeit zur generellen Transduktion; frühe Gene; vergl. 7.1.4) entstanden ist und sich im Verlauf der Evolution als mehr oder weniger stabiler, eigenständiger Phage etabliert hat. ES18h1 erscheint nach diesen Ergebnissen als ein reizvoller Kandidat für weitere Untersuchungen zur Evolution der gesamten lambdoiden Phagengruppe bei E.coli und S.typhimurium .

Bei dem Phagen KB1 stellt sich die Situation insofern anders dar, als er morphologisch (und auch nach dem Protein- und DNA-Muster) durchaus Gemeinsamkeiten zu den übrigen A-Phagen hat. Er selbst gehört allerdings zu den Typ B-Phagen (Boro und Brenchley, 1971). KB1 ist offenbar genetisch jedoch von den anderen untersuchten Phagen so weit entfernt, daß kein einziger der geprüften Amber-Phagen durch Rekombination mit KB1 seinen Amber-Defekt restaurieren konnte.

8.4 Sequenzanalysen

8.4.1 Modelle für die Interaktion von Genprodukt 3 mit pac

Die Weise, in der Restriktionsendonukleasen vom Typ II spezifisch ihre Schnittstelle erkennen und spalten, schien ebenso wie für die funktionell analoge "Ter-Aktivität" des Phagen Lambda auch eine gute Erklärung für das Zustandekommen der pac Schnitte bei dem mit Lambda verwandten Phagen P22 zu liefern. Es läßt sich aus der Literatur erkennen (Schmieger und Backhaus, 1976; Tye, 1974a), daß mindestens für einige Zeit die Anstrengungen dahin gingen, dieses plausibel scheinende Modell experimentell zu bestätigen. Mit dem Modell können die Schnittstellen, die unabhängig von Casjens und Huang (1982) und Backhaus (1985) gefunden wurden, als Ergebnis einer nicht absoluten Präzision der Nukleaseschnitte (etwa mit der weniger spezifischen "Stern"-Aktivität mancher Restriktionsenzyme vergleichbar) erklärt

werden, die an mindestens fünf verschiedenen, einander aber ähnlichen pac Stellen erfolgen. Die Häufigkeit der Initiation der Verpackung an einer solchen pac Stelle hinge mit kleinen Unterschieden in der Sequenz zusammen, die eine bessere oder schlechtere Erkennbarkeit durch das "Initiationsprotein" zur Folge haben (Earnshaw und Casjens, 1980).

Im folgenden werden dieser Vorstellung widersprechende Daten und weitergehende Untersuchungen aufgeführt, die Zweifel an der Richtigkeit des Modells bestärkten. Der genauere Vergleich der fünf Hauptschnittregionen (Backhaus, 1984) zeigte keine überzeugenden Sequenzhomologien und führte zu dem Schluß, daß die spezielle Verteilung der Schnittstellen nicht eine Eigenschaft der Sequenzen der Schnittstellen ist (wie das Modell es voraussagt). Adams et al. (1983) und Backhaus (1984) postulieren statt dessen ein einziges pac Signal als ausreichend für die Initiation der Schneidereaktion. Die Initiation des Prozesses ist dabei als spezifische Erkennung und eventuell spezifische Bindung zu verstehen, die jedoch bisher nicht definitiv gezeigt werden konnte. Das Prinzip von räumlich getrennter Erkennungs- und Schneideregion ist beispielsweise bei Restriktionsenzymen vom Typ I oder III verwirklicht. Auch bei anderen DNA-Phagen, die wie P22 generell zu transduzieren vermögen, werden mittlerweile Modelle diskutiert, die z.T. starke Anlehnung an die Überlegungen für P22 aufweisen (T1: Liebeschuetz und Ritchie, 1986; SPP1: Deichelbohrer et al., 1982; Mu: Teifel-Greding, 1984).

Die Heterogenität und vermeintlich fehlende Präzision der pac Schnitte läßt sich unter diesem Aspekt anders erklären. Auffällige Regelmäßigkeiten innerhalb der Hauptschnittstellen (zwei bp-Abstände) und zwischen den Schneideregionen (18-20 bp) legen es nahe, einen allosterischen Effekt zwischen Substraterkennung und Nukleaseaktivität in der Form einer Bindung einer Domäne des beteiligten Proteins an die pac Stelle und die darauf folgende Aktivierung einer zweiten Domäne zu postulieren. Es muß sich dabei nicht notwendigerweise um einen Effekt innerhalb des gleichen Proteins handeln. Genetische Daten, Ko-Sedimentationsversuche und in vitro DNA-Verpackungsexperimente (Poteete und Botstein, 1979; Strobel et al., 1984) zeigen, daß Gen-

produkt 2 unbedingt während der ersten Schritte der DNA-Verpackung benötigt wird. Es darf mit guten Gründen vermutet werden, konnte aber bislang nicht schlüssig gezeigt werden, daß gp2 die Nukleasefunktion in dem Komplex liefert.

8.4.2 Vergleich der Situation bei P22 mit der Terminasefunktion von Lambda

Die Ähnlichkeit von P22 mit Lambda legt die Analogisierung von gp3 mit gpNu1 und gp2 mit gpA nahe, wenngleich das für sich kein Beweis ist. Es gibt aber mehrere Gründe, die einen strukturellen Vergleich der Komplexe Nu1/A und 2/3 als sinnvoll erscheinen lassen:

1. Es gibt zahlreiche funktionelle Ähnlichkeiten zwischen beiden Phagentypen.

2. Der genetische Ort beider Komplexe kartiert jeweils am linken Ende des Phagengenoms, wobei A bzw. 2 rechts von Nu1 bzw. 3 kartieren.

3. Beide Komplexe sind in ihrer Funktionsfähigkeit ATP-abhängig (P22: Poteete und Botstein, 1979; Lambda: Feiss und Becker, 1983)

4. Die aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Molekulargewichte der Genprodukte sind jeweils in derselben Größenordnung (gpNu1: 20.4 kD, gp3: 18 kD; gpA: 73.3 kD, gp2: 67 kD).

Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß im Gegensatz zu Lambda, der bei der Verpackung klar definierte cos-Enden erzeugt und sein Genom ohne terminale Redundanz in der Hülle unterbringt, P22 und verwandte Phagen nach dem "Headful"-Prinzip DNA verpacken. Dies erfordert, daß in irgendeiner Weise ein Signal erfolgt, wenn der Phagenkopf "voll" DNA ist und eine Art "Übertragung" des DNA-Endes (eventuell mit dem gebundenen gp3-gp2-Komplex) auf einen neuen Prohead stattfinden muß, um mit dem DNA-Konkatemer weitere Phagenköpfe füllen zu können.

Laski und Jackson (1982) beobachteten freilich, daß der pac Schnitt bei Mutanten, die nur defekte Proheads herstellen können, auch ohne gleichzeitige DNA-Verpackung stattfindet, wobei aber nichts bekannt ist über die daraus resultierenden Molekülenden. Insoweit läßt sich die Initiation der Verpackung bei P22 sinnvoll mit Lambda vergleichen.

Entsprechend würden die Genprodukte 3 und 2 als Kompo-

nenten des Terminasekomplexes spezifisch interagieren. Über die stöchiometrischen Verhältnisse von gp3 zu gp2 können noch ebensowenig begründete Aussagen getroffen werden wie über eine (denkbare) Beteiligung von Wirtskomponenten.

Ein Punktmatrixvergleich der DNA-Sequenzen von Gen 2 (LP7) mit A (Fig. 14) bringt selbst bei einem relativ geringen Homologiekriterium von fünf konsekutiven homologen Paaren keine auffälligen Ergebnisse. Der von Backhaus (1984) durchgeführte Vergleich von Gen 3 mit Nu1 führte auch bei diesem Paar zu dem Ergebnis, daß es keine überzeugenden Sequenzhomologien gibt. Es ist folglich aufgrund der sehr hohen Homologie zwischen 3 (LP7) und 3 (P22) kaum überraschend, daß es auch zwischen 3 (LP7) und Nu1 (Fig. 15) im Punktmatrixvergleich keine auffälligen Sequenzhomologien gibt, während der Vergleich der beiden gp3 die von der Sequenz her bekannte extrem hohe Homologie in einer langen Geraden von Punkten zeigt. Bei dieser Darstellung läßt sich auch leicht das auffällige Phänomen wiedererkennen, daß unmittelbar vor dem Start der gp3 die Homologie abrupt aufhört. Man erkennt, daß - mindestens in dem sequenzierten Bereich - auch nicht durch Einbeziehung von Deletionen oder Insertionen (die in einem Matrixplot als parallel versetzte Gerade erkennbar wären) homologe Bereiche vor dem Start von Gen 3 gefunden werden können.

Fig. 14. **Punktmatrixvergleich der Gene 2 (LP7) und A (Lambda)**

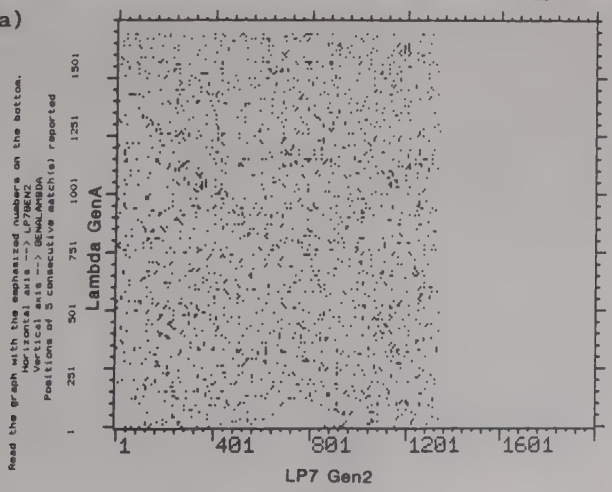
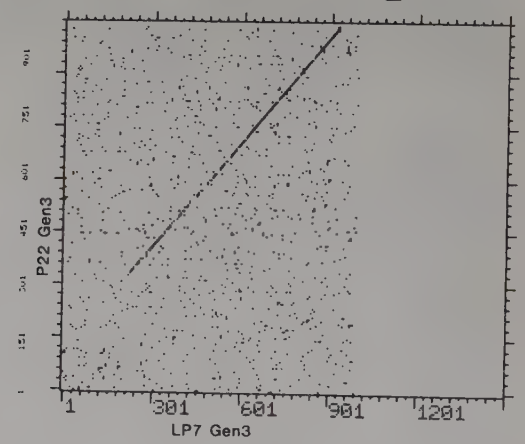
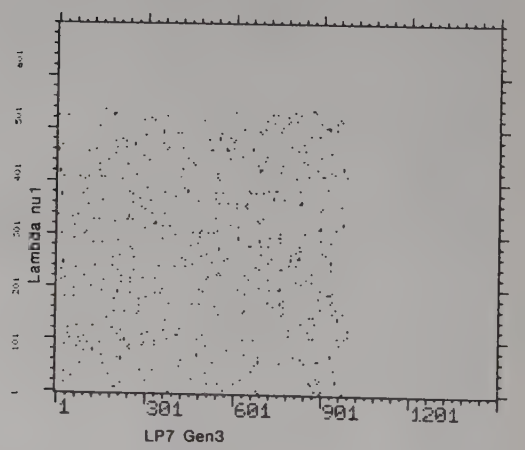
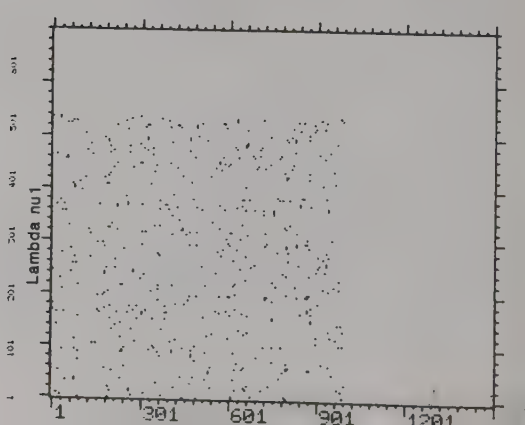


Fig. 15. **Punktmatrixvergleiche der Gene 3 (LP7), 3 (P22) und Nu1 (Lambda)**







8.4.3 Typen DNA-bindender Proteine

Man könnte sich freilich vorstellen und kennt dafür auch Beispiele (z.B. O (Lambda) und 18 (P22); Backhaus und Petri, 1984), daß trotz verschiedener Primärstrukturen Proteine mit vergleichbarer Funktion mindestens partiell Ähnlichkeiten in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur aufweisen. Nach typischen Merkmalen wie ausgeprägt hydrophilen Bereichen, ß-Faltblattstrukturen oder Helix-Turn-Helix-Folgen, die häufig bei DNA-bindenden Proteinen anzutreffen sind (Review: Pabo und Sauer, 1984), wurden gp3(P22) und gpNu1(Lambda) (Backhaus, 1984) und gp3(LP7) und gpNu1, gp2(LP7) und gpA(Lambda) (diese Arbeit; Fig. 11,12,13) untersucht und verglichen. Jedoch auch solche Vergleiche geben keine Hinweise auf enge strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den entsprechenden Lambda- und P22- bzw. LP7-Proteinen. Die Hydrophilizitätsmuster von gp3 und Nu1 sind vollständig verschieden voneinander. Genprodukt Nu1 weist insgesamt wesentlich mehr hydrophile Bereiche auf als Genprodukt 3, aber auch die Verteilung der Maxima bei gpNu1 ist vollkommen unähnlich zu gp3. In jüngster Zeit wurden eine Reihe von DNA-bindenden Proteinen aus verschiedenen Quellen beschrieben (Miller et al., 1985; Berg, 1986a,b; Vincent, 1986; Harrison, 1986), bei denen sog. "Finger" als die Domänen postuliert wurden, die mit DNA spezifisch in Interaktion treten. Diese Finger sind Schleifen aus etwa 30 Aminosäuren, die durch quaternäre Metalliganden wie Zn^{++} über Querverbindungen an Cystidin- und Histidinresten stabilisiert werden. Eine Untersuchung der Genprodukt 3-Sequenzen (und von Genprodukt Nu1) nach den in den genannten Arbeiten beschriebenen charakteristischen Folgen von Cystidin und Histidin ergab freilich keine Hinweise darauf, daß hier etwas Vergleichbares vorlegen könnte. Alle geprüften gp3 und gpNu1 fallen im Gegenteil geradewegs durch ihre Armut an diesen beiden Aminosäureresten auf (gp3: 2 x cys, 1 x his; gpNu1: 1 x cys, 2 x his).

Auch die Proteinsequenzen von gp2 und gpA, die möglicherweise direkt in Wechselwirkung mit der DNA treten, wurden nach auffälligen Cys-His-Folgen hin untersucht. Die entsprechenden Positionen sind in Fig. 13 markiert. Nach den Merkmalen, die für prokaryotische "Finger" in der Ve-

gleichstabelle in Berg (1986a) aufgelistet sind, lassen sich ausschließlich aus der Sequenz durchaus Ähnlichkeiten entdecken, die eine Postulierung von jeweils zwei Fingern bei gp2 und gpA zulassen. Derartige Sekundärstrukturen können hier zwar diskutiert werden, solange aber der Nachweis nicht geführt ist, daß die fraglichen Proteine tatsächlich (und in welchen stöchiometischen Verhältnissen) Metallionen gebunden haben, sollten weiterreichende Schlußfolgerungen vermieden werden. Es darf insgesamt nicht außer acht gelassen werden, daß mit den zur Verfügung stehenden Mitteln und Daten keine definitiven Aussagen gemacht werden können. Die Darstellung zur Homogenität und anschließende detailierte biochemische Untersuchungen der fraglichen Proteine stehen noch aus. Mit homogenen Proteinpräparationen ließen sich eine Reihe von Fragen in Verbindung mit den bereits vorhandenen Daten klären.

Es sollte an diesem Punkt darauf hingewiesen werden, daß eine zu sehr vertiefte Suche nach funktionellen und strukturellen Gemeinsamkeiten bei der Initiation der Verpackung von P22/LP7 und Lambda auch in die Irre führen könnte. Der Ort der spezifischen Erkennung (also definitionsgemäß die pac site) liegt bei Lambda außerhalb von Nu1 , während sie bei P22 und LP7 innerhalb der kodierenden Sequenz von Gen 3 liegt. Das Ergebnis des Initiations-/ Terminationsschnittes bei Lambda (die sog. cos site) erinnert an eine (längere) Schnittstelle eines Restriktionsenzymes, während bei den von P22 erzeugten Enden keine besonderen Symmetrien oder dergleichen zu beobachten sind.

8.5 Analyse und Vergleich von gp3 bei P22, P22 HT-Mutanten und LP7

8.5.1 Signalelemente der Translation

Das Vorliegen der Gen 3 -Sequenzen mehrerer HT-Mutanten von P22 und des eigenständigen, aber verwandten Phagen LP7 ermöglicht erstmals einen direkten Vergleich auf den zwei Ebenen DNA- und (abgeleiteter) Proteinsequenz. Die Sequenzdaten über einen Abschnitt von LP7, der nicht aus dem Gen 3/2 Bereich stammt, aber ein pac Signal enthält (pGM4004),

erlauben sogar noch weitergehende Aussagen über die Natur der pac site selbst.

Die Kenntnis der Position des Startkodons von Gen 3 bei LP7, das aus der DNA-Sequenz eindeutig zu entnehmen ist, ermöglicht die Beantwortung einer Frage, die bislang für P22 nicht abschließend beantwortet werden konnte. Vor dem sowohl bei LP7 wie bei P22 vorhandenen ATG (LP7: Pos. 1) gibt es bei P22 zwei Kodons zuvor eine weitere ATG-Folge und ab dort einen durchgehenden Leserahmen bis zum jeweiligen Stoppkodon. Aus der Tatsache, daß bei LP7 nur ein ATG vorhanden ist, dem zudem im korrekten Abstand eine ziemlich perfekte "Shine-Dalgarno-Sequenz" (1974; in Fig. 8 markiert) vorausgeht, wird gefolgert, daß auch bei P22 die zweite ATG-Folge als Startkodon benutzt wird. Bei P22 ist die Übereinstimmung des Bereiches vor dem Start mit der publizierten Shine-Dalgarno - Sequenz nicht so perfekt wie bei LP7 (A-G-G-A-G-G-(7)-ATG; P22: A-A-G-T-G-A-G-A-(5)-ATG), aber immerhin deutlich besser als vor der ersten ATG-Folge. Die Kombination der beiden Argumente gestattet eine weitgehend sichere Aussage auch über das bei P22 tatsächlich benutzte Startkodon. Die Gene 3 beider Phagen enden jeweils mit zwei Stoppkodons.

8.5.2 pac Signal-abhängige Transduktion; grobe Lokalisierung des Signals

Bei der Betrachtung des Genes 3 muß strikt zwischen der Proteinebene und der DNA-Ebene, also dem Signal, unterschieden werden. Die Genprodukte 3 von verschiedenen Phagen zeigen unterschiedliche Spezifität sowohl für das eigentliche pac Signal, das bei der Initiation der Verpackung erkannt wird, wie bei der Erkennung von pac site-ähnlichen DNA-Abschnitten auf der Phagen-DNA und auf bakterieller DNA.

Die Transduktion bakterieller Marker wurde bereits weiter oben diskutiert (vergl. 8.1). Bei der erf recA Transduktion wurde immer die Erkennung von pac Signalen aus verschiedenen Quellen durch P22 gemessen und mit der Erkennungsrate des P22-eigenen pac Signals verglichen. Insofern stellt das pac Signal von Wildtyp P22 die Referenz dar. Es würde den Vergleich unübersichtlich machen, erf Mutanten z.B. von [illegible]27 oder [illegible]-Mut[illegible] zu suchen und damit

analoge Transduktionsexperimente durchzuführen. Die Tatsache, daß bei allen untersuchten Phagen-DNAs mit Ausnahme von HT12/4 bei einer Spaltung mit EcoRI eine unterrepräsentierte EcoRI-Bande D zu sehen ist, spricht stark dafür, daß die Signalspezifität von LP7, HT13/4 und HT103/2 mindestens ähnlich zu der von Wildtyp P22 ist. Von Backhaus (1984) wurde ein HaeIII-Fragment, das bei LP7 Pos. 209 bis 376 entspricht (Fig.8), als die Region, die wahrscheinlich das pac Signal enthält, bestimmt. Ein Vergleich der entsprechenden Sequenzen von P22 (Backhaus, 1985) und LP7 (Fig. 8) ergibt keine unmittelbaren Hinweise auf die pac Sequenz, da - wie überall bei 3 (LP7) und 3 (P22) - der Homologiegrad sehr hoch ist. Die grobe Lokalisierung des pac Signales durch Backhaus in dem HaeIII-Fragment wurde in dieser Arbeit über einen anderen Weg (für LP7) bestätigt, wie der Vergleich der Transduktionsfrequenzen bei den Klone pGM4006, pGM4007 und pGM4014 zeigt (Tab. 6). Die gleichen Symmetrieelemente wie bei P22 lassen sich auch in der betreffenden Sequenz von LP7 feststellen. Gerade einen Sequenzabschnitt, den Casjens et al. (1987) an zwei weiteren Positionen von HT12/4 gefunden haben, die mit der Verpackungsinitiation von HT12/4-DNA (als Signal) zu tun haben (5'-A-GATTTA), gibt es in perfekter Form bei LP7 nicht (5'-A-GACTTA).

Bei näherer Betrachtung ist das allerdings nicht sehr überraschend: mit einer vollkommen identischen Sequenz bei drei verschiedenen Phagen lassen sich Unterschiede in der pac Spezifität nicht erklären. Da wahrscheinlich HT12/4 von P22 nur in dem einen G-->A Austausch (Pos. 241; Fig. 8) abweicht (was sofort impliziert, daß auch HT12/4 das P22-spezifische pac Signal trägt!), kann man begründet annehmen, daß auch Wildtyp P22 die beiden Bereiche HTpac1 und HTpac2 in identischer Weise besitzt, aber nach allen vorliegenden Restriktions- und Transduktionsdaten nicht als pac site benutzt. Als Erklärung der Unterschiede zwischen P22 und HT-Mutanten ist eine veränderte Spezifität des gp3 aufgrund der Mutationen naheliegender.

Dagegen ist bei LP7 nicht auszuschließen, daß neben der Spezifität von gp3(LP7) auch die pac site(LP7) selbst mehr oder weniger geringfügig verändert ist, da es gerade in dem Bereich des HaeIII-Fragmentes, das nach Backhaus vermutlich

das pac Signal enthält, eine Reihe von Basenänderungen zu P22 gibt. Die meisten der Änderungen betreffen die dritten Kodon-Positionen, so daß die Aminosäuresequenz nicht verändert wird (Beispiele: gp3(LP7) Pos. 2, 9, 15, 18-20; an Pos. 65 und 87 werden sogar zwei Basenaustausche im Triplett toleriert).

8.5.3 Bestimmung der pac Signalsequenz

In diesem Zusammenhang interessanter ist jedoch das TaqI-Fragment aus dem PstI-Fragment D1 von LP7, das nach den biologischen Kriterien ein pac Signal enthält, aber nichts mit dem Verpackungsvorgang selbst (in Form einer Beteiligung als Signal oder als Proteinkomponente) zu tun hat. Die Suche nach Homologien zwischen Gen 3 (LP7) und der Sequenz von pGM4004 war zunächst ergebnislos.

Erst die Einbeziehung von anderen Kriterien wie Symmetrien oder Purin-Purin- bzw. Pyrimidin-Pyrimidin-Übereinstimmungen in den Vergleich brachte Ergebnisse. Symmetrien in Basenfolgen, die man im übrigen in beliebigen DNA-Sequenzen relativ häufig findet, ohne daß Signale für DNA-bindende Proteine enthalten sind, für sich allein sind nicht aussagekräftig, solange man die Signalstruktur selbst nicht kennt. Die starke Häufung von Palindromen (verg. Fig. 8 und 9) sowohl in dem vermutlichen pac Signal-Bereich (und/oder der Schneideregion) und dem TaqI-Fragment von pGM4004 ist immerhin sehr auffällig und wurde in ähnlicher Weise für die entsprechende Region bei P22 beobachtet (Backhaus, 1984). Noch interessanter ist ein Abschnitt von 18 bp, der bei einem Homologievergleich mit den relativ weniger spezifischen Anforderungen einer Übereinstimmung gleicher Basentypen (Purin-Purin, Pyrimidin-Pyrimidin) bei Gen 3 (LP7), Gen 3 (P22) und pGM4004 gefunden wird (Fig. 16). Vergleiche mit beliebigen anderen Phagen-Sequenzen wie z.B. Gen 2 (LP7), Gen 18 und 12 (P22) (Backhaus und Petri, 1984) zeigten, daß dort exakt diese Sequenz nicht auftaucht. (Bei einem unter den gleichen Bedingungen transduzierbaren MboI-Fragment aus S.typhimurium - als I15 bezeichnet - wurde dagegen kürzlich eben diese Sequenz gleichfalls gefunden; F. Schindler, persönl. Mitteilung). Der Grad der Übereinstimmung der tatsächlichen Sequenz mit der entsprechenden

Sequenz von P22 variiert: die Homologie zwischen P22 und LP7 ist deutlich höher (17 bp von 18 bp) als die zwischen P22 und pGM4004 (6 bp von 18 bp). Vergleicht man jedoch anstelle der echten Basenhomologie Basentypen, dann stimmen immerhin 16 von 18 Positionen bei allen verglichenen Sequenzabschnitten überein. Der Vergleich der in Frage kommenden DNA-Abschnitte und die daraus abgeleitete Konsensus-Sequenz bzw. die Purin-Pyrimidin Konsensus-Sequenz ist in Fig. 16 dargestellt. Die Tatsache, daß beim Vergleich mehrerer (unabhängig voneinander gefundener) transduzierbarer DNA-Stücke immer wieder ein gemeinsamer Sequenzabschnitt gefunden wird, spricht dafür, daß es sich dabei um einen für die Initiation der Verpackung wesentlichen Bereich handelt. Mit dieser Aussage wird nicht ausgeschlossen, daß noch weitere Signale (die allerdings wahrscheinlich im Falle der Wildtyp pac site ebenfalls im Gen3 liegen müßten) existieren.

Dafür, daß das Auftreten des gefundenen Sequenzabschnittes in den untersuchten Sequenzen in Zusammenhang mit der biologischen Eigenschaft der pac- oder "Pseudo pac Erkennung steht, sprechen die folgende Zahlen zur Wahrscheinlichkeit des Vorkommens solcher Folgen: eine bestimmte Folge von 16 Purin- und Pyrimidinbasen sollte einmal in 1.53×10^5 Basen auftreten. Tatsächlich sind alle hier betrachteten Sequenzen wesentlich kürzer: P22/LP7: 4.2×10^4, pGM4004: 4×10^2, I15: 1.1×10^2, (Tn10: 1×10^4).

Es wäre reizvoll, diesen Abschnitt und ggf. Varianten davon als Oligonukleotide zu synthetisieren und in pUC-Plasmide zu klonieren. Es ließe sich damit überprüfen, ob schon dieser Abschnitt für eine Plasmidtransduktion unter erf recA Bedingungen ausreicht.

Fig. 16. **Vergleich der potentiellen pac Signale und die daraus gefolgerte Konsensus-Sequenz** (Y = Pyrimidin; R = Purin)

P22:	Pos.658	G-A-C-C-T-T-C-T-C-A-A-C-G-C-T-A-A-C
LP7:	Pos.340	G-A-T-C-T-T-C-T-C-A-A-C-G-C-T-A-A-C
HT13/4:	Pos.340	G-G-C-C-T-T-C-T-C-A-A-C-G-C-T-A-A-C
4004:I	Pos.225	G-A-T-T-A-T-T-A-A-G-T-G-A-C-G-G-A-T
4004:II	Pos.249	T-A-T-T-T-T-A-C-T-C-C-A-G-A-C-A-A-T
I15:		G-G-T-T-T-C-T-T-T-G-G-C-G-T-C-G-A-T
Konsensus:		G-A-T---T-T----------G-----A-A--
PuPy-Konsensus:		R-R-Y-Y-Y-Y-Y-Y-Y-R-----R-Y-Y-R-R-Y

Interessanterweise gibt es zwischen einem Abschnitt aus dem rechten IS-Element des Transposons Tn10 und P22 bzw. LP7 eine starke Homologie auf dem Purin/Pyrimidin-Niveau. Der homologe Bereich liegt unmittelbar rechts von der in Fig. 16 als pac Signal bezeichneten Basenfolge. Bemerkenswert ist diese Beobachtung deshalb, weil auch Tn10 unter erf recA Bedingungen erhöhte Transduktion zeigt (Schmieger, unveröffentlichte Daten).

Die Annäherung an die "ideale" pac Sequenz von P22 würde bei jeder untersuchten Sequenz in der Transduktionsfrequenz unter erf recA Bedingungen (und annähernd gleichen Plasmidbedingungen) zum Ausdruck kommen. Tendentiell bestätigen die gefundenen Transduktionswerte (Tab. 6) diese Annahme. Es muß allerdings die Einschränkung gemacht werden, daß die Konstruktionsweise der Plasmide im Verlauf der Arbeit verändert wurde (Vektor pUC8/19 anstelle von pBR325), was eventuell einen gewissen Einfluß auf die Transduktionsfrequenzen (durch die Häufigkeit der Multimerbildung der Plasmide) hat.

8.5.4 Plasmidtransduktion

Die Frage, wie es überhaupt in der infizierten, plasmidtragenden Zelle zur Bildung von verpackbaren Plasmidkonkatemeren kommt, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht (wäre jedoch in einer Fortführung lohnend). Aus früheren Arbeiten (teilweise auch über andere Bakteriophagen wie z.B.

P1; N. Sternberg) gibt es Hinweise und Befunde, daß nach der Initiation der Repliation die zunächst in der Theta-Form anlaufende Replikation umgeschaltet wird in einen "Rolling-circle-Modus", der letztlich bei der Phagen-DNA zum Substrat der Verpackung, den DNA-Konkatemeren führt. Um bei kleinen Plasmiden wie beispielsweise pGM4004 (3.1 kb) zu DNA-Längen zu gelangen, die einen Phagenkopf füllen können, muß das Plasmid mindestens als Tridekamer in Tandemform vorliegen. Aus nicht-infizierten Zellen (insbesondere recA Stämme) lassen sich normalerweise solch lange Oligomere nicht gewinnen. Daher liegt die Vermutung nahe, daß eine Oligomerbildung des Plasmids in (irgendeiner) Weise nach der Infektion der Zelle durch den Phagen induziert wird. Eine reizvolle Denkmöglicheit wäre, daß die pac site das Umschaltsignal von der Theta-Replikation in eine phagenspezifsche "Rolling-circle-Replikation" darstellt.

Befunde von Backhaus und Schmieger (1979a,b) aus der Untersuchung von Thymidin/Bromuracil-Dichte-markierten Lysaten von HT12/4 zeigen deutlich, daß "schwere" bzw. "superschwere" transduzierende Partikel phagenkontrolliert und wirtsunabhängig entstehen. Auch unter nicht-permissiven Bedingungen in einer für die Initiation der bakteriellen Replikation temperatursensitiven Mutante wird chromosomale DNA nach Phageninfektion repliziert und in transduzierenden Partikeln wiedergefunden. Aus diesen Befunden läßt sich ohne weiteres erklären, warum nur in der Nähe von bakteriellen Quasi pac sites verpackbares DNA-Material existiert. Nur dort nämlich kann der phagenspezifische Replikationsapparat ansetzen und nach der Infektion chromosomale DNA replizieren, die anschließend anstelle von Phagen-DNA in Phagenköpfe verpackt werden kann, während der Replikationsapparat des Wirtes bald nach der Infektion radikal abgeschaltet wird.

Auch unter Berücksichtigung dieser Befunde wäre erklärbar, daß bei Plasmiden ohne P22 pac Signal nach Infektion mit P22 keine Plasmidtransduktion stattfindet, weil aufgrund des fehlenden Umschaltsignales keine phagenspezifische "Rolling-circle-Replikation" stattfindet und entsprechend keine Plasmidkonkatemere in verpackbarer Länge vorliegen. Diese Variante steht nicht in völligem Gegensatz zu der

Erklärung, daß die pac site das Startsignal für die Verpackungsmaschinerie des Phagenkopfes ist, sondern verlagert den Vorgang auf die Frage, ob die Konkatemerbildung stattfinden kann oder nicht. Wie allerdings oben angedeutet wurde, ist diese Möglichkeit zunächst weitgehend spekulativ und bedarf noch der Erhärtung durch weitere experimentelle Daten.

Festzuhalten bleibt, daß - unabhängig voneinander - DNA-Homologievergleiche und Transduktionswerte in die gleiche Richtung weisen und die Lokalisierung des pac Signals in dem oben erwähnten HaeIII-Fragment, die von Backhaus (1984) bereits als wahrscheinlich bezeichnet wurde, als gute Arbeitshypothese untermauern.

Die zweite Komponente, die in dem System Einfluß auf die spezifische pac Signal-Erkennung hat, ist Genprodukt 3. Wie weiter oben einschränkend bemerkt wurde, werden in dem hier benutzten System Transduktionswerte immer nur im Hinblick auf gp3(P22) ermittelt. Daß zwischen den einzelnen Phagen bzw. Phagenmutanten Unterschiede hinsichtlich der pac Spezifität bestehen, wird aus dem biologischen Verhalten klar.

8.5.5 Vergleich der Genprodukte 3

Der Vergleich der verfügbaren sieben Genprodukt 3-Varianten, die nach den Algorithmen von Chou und Fasman (1974), Robson et al. (1985) und Kyte und Doolittle (1982) geprüft wurden, läßt einige (vorsichtige) Schlüsse zu.

Übereinstimmend kann für alle untersuchten Proteine festgestellt werden, daß im C-terminalen Bereich (ab aa 140) basische Aminosäuren überwiegen (mit Abstrichen trifft dies auch für die Region unmittelbar nach dem N-Terminus zu), während im mittleren Abschnitt eher saure Aminosäuren überwiegen oder die Ladungen ausgeglichen sind. Wie die Hydrophilizitätsgraphen (Fig. 12) zeigen, sind die Enden der Proteine (auch hier wiederum besonders der C-Terminus) deutlich mehr hydrophil als die inneren Abschnitte.

Die veränderten Positionen in den Genprodukte 3 der fünf HT-Mutanten betreffen ausnahmslos Aminosäuren im mittleren Bereich (aa 80 - 120) und lassen sich nach den vorliegenden Daten in drei Gruppen einteilen: die Mutationen

von HT12/4 und HT103/2 betreffen die zwei unmittelbar benachbarten Kodons Pos. 80/81; die zwei Änderungen bei HT13/4 liegen 31 bzw. 33 Kodons abwärts von der Mutation bei HT12/4 und ebenfalls dicht beisammen. Die beiden Basenaustausche bei HT102/3 betreffen nur ein Kodon, wodurch eine polare ungeladene Aminosäure in Pos. 112, die auch bei HT13/4 betroffen ist, durch eine geladene Aminosäure ersetzt wird (glu). Das entsprechende gp3(LP7) weist zwar eine größere Anzahl (7) über die Sequenz verteilter Änderungen von Aminosäuren auf, von denen jedoch nur ein einziger Austausch eine Ladungsänderung in dem Genprodukt bewirkt. Gerade dieser bemerkenswerte Austausch liegt zwischen den beiden bei HT13/4 betroffenen Aminosäuren. Ein dritter Bereich könnte um Aminosäure 90 liegen, wo bei HT17/1 die einzige Änderung liegt. S. Casjens hat die Mutationsorte von fünf weiteren HT-Mutanten ebenfalls um Pos. 90 bestimmt (persönliche Mitteilung).

In Verbindung mit den Vorhersagen der Sekundärstruktur kann aus diesen Daten der Schluß gezogen werden, daß für die biologische Funktion von Genprodukt 3 als dem Protein, welches das pac Signal erkennt, mindestens zwei oder drei Abschnitte ("Domänen") verantwortlich sind. Änderungen in der Aminosäure-Sequenz in mindestens einer dieser Domänen können einen Unterschied in der pac Spezifität bewirken. Die geprüfte geringe Anzahl von HT-Mutanten läßt selbstverständlich keine abschließende Aussage zu. Die Tatsache jedoch, daß die vermutlich entscheidende Änderung bei einer anderen Phagenart genau in der gleichen Region liegt wie bei zwei der HT-Mutanten, stützt die Aussage beträchtlich.

In der Vorhersage der Sekundärstruktur ergibt sich durch den Austausch bei HT12/4 eine besonders drastische Änderung, da dort ein sehr langer helikaler Bereich (vergl. Fig. 11) entsteht, der beim Genprodukt 3 des Wildtyps (rechnerisch) nicht existiert. Bei den anderen gp3 sind die Änderungen gegenüber dem des Wildtyps nicht so drastisch. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem biologischen Verhalten der Phagen, bei denen ebenfalls besonders HT12/4 dadurch abweicht, daß er eine sehr hohe Transduktionsfrequenz (Schmieger, 1972) hat und die originale pac site nicht benutzt. Durch die Mutationen sind die Genprodukte 3

von HT13/4, HT17/1, HT103/2 und HT102/3 offenbar mindestens soweit verändert, daß ihre Spezifität abgenommen hat oder verändert ist. Das äußert sich in einer erhöhten Transduktionsfrequenz bei bakteriellen Markern; das originale pac Signal jedoch wird im Gegensatz zu HT12/4 weiterhin erkannt und benutzt. Wäre bei diesen HT-Mutanten das pac Signal selbst anstelle der Spezifität des Genproduktes verändert, wäre schwer zu erklären, warum Wildtyp P22 nicht neben dem eigentlichen Signal auch die sekundären Signale, die HT12/4 benutzt (Casjens et al., 1987), zumindest in seltenen Fällen erkennt. Vermutlich sind diese potentiellen Signale beim Wildtyp und den übrigen HT-Mutanten vorhanden, werden jedoch in keinem Fall benutzt.

Für LP7 läßt sich diese Aussage nicht so eindeutig treffen, da zwar (im PstI-Muster) die unterrepräsentierte Bande F mit pGM1000 und pGM4005 hybridisiert, was für ihre Herkunft als Ergebnis des zu P22 analogen Schnittes im pac Signalbereich spricht. Es gibt jedoch noch eine weitere (sehr dünne) unterrepräsentierte Bande oberhalb der Bande PstI-G, mit der pGM4005 nicht hybridisiert. Diese Bande könnte aufgrund eines (selteneren) Schnittes an einem der beiden sekundären pac Signale in PstI-D1 oder D2 entstehen, wofür allerdings die entsprechenden Hybridisierungsdaten keinen eindeutigen Nachweis liefern (Daten nicht gezeigt).

Um weiterreichende Aussagen über das Genprodukt 3 machen zu können, wäre es sehr hilfreich, Daten aus proteinchemischen Untersuchungen in die Überlegungen mit einbeziehen zu können. Die computergestützten Analysen allein aufgrund der ermittelten Primärsequenz geben zwar wertvolle Hinweise auf wahrscheinliche Sekundärstrukturen, können aber selbstverständlich nicht den Nachweis derselben realiter ersetzen.

8.5.6 Genprodukt 2(LP7) und LP7ORF1; Pst-D1 und Pst-D2

Soweit die Sequenz des Genes 2 von LP7 bestimmt wurde, kann der Versuch unternommen werden, analog zum Vergleich gp3 mit Nu1 von Lambda gp2 mit gpA von Lambda zu vergleichen unter der Voraussetzung, daß beide Paare von Genprodukten in derselben oder mindestens sehr ähnlicher Weise miteinander agieren. Doch auch in diesem Fall bringt die erste Analyse

nur negative Ergebnisse, da weder der Vergleich der Hydrophilizitätsmuster (Fig. 13) beider Genprodukte besondere Ähnlichkeiten zutage fördert noch ein direkter Vergleich der DNA-Sequenzen irgendwelche "überstatistische" Homologien zeigt.

Eine weitere Frage, nämlich die hinsichtlich des Starts von Gen 2 (sowohl bei LP7 wie bei P22), kann durch die Möglichkeit des Vergleiches beider Sequenzen jetzt mit einiger Gewißheit beantwortet werden. Im Anschluß an die kodierende Sequenz von Gen 3 (P22) konnte Backhaus keine schlüssig erscheinende ATG-Startstelle für das folgende Gen 2 (P22) entdecken. Die einzig plausibel erscheinende Startstelle gab eine GTG-Folge 23 bp vor dem Terminationskodon von Gen 3 (P22) her. Diese Stelle kann in exakt der gleichen Folge auch bei LP7 gefunden werden. Im Unterschied zu der noch nicht bekannten weiteren Sequenz von Gen 2 (P22) kann jetzt auf die entsprechende Sequenz von LP7 zurückgegriffen werden.

GTG als Startkodon wird bei lambdoiden Phagen in seltenen Fällen anstelle von ATG benutzt. Auffallend ist, daß gerade auch das Gen A (Lambda) mit einem GTG beginnt (Sanger et al., 1982), wobei zudem - in ganz ähnlicher Weise wie für LP7 und P22 postuliert - der Start des folgenden Genes mit dem Ende des vorausgehenden Genes verschränkt ist (26 bp vor dem Nu1 Terminationskodon; vergl. Sanger et al., 1982). Bei LP7 und P22 spricht weiterhin für gerade diese GTG-Folge als Startkodon, daß - im Gegensatz zu später folgenden ATG-Folgen (91 Kodons und weiter abwärts!) - vor dem vermutlichen Start eine (potentiell) gute Shine-Dalgarno-Sequenz vorhanden ist (A-A-G-G-A-G-(10)-GTG).

Über den (relativ) kurzen offenen Leserahmen LP7-ORF1 (70 Kodons) vor dem Gen 3 (LP7) können hier keine substantiellen Aussagen mangels weiterer Daten, gemacht werden, insbesondere auch, weil die Sequenz erst ab der EcoRV-Stelle bestimmt wurde. Bei P22 allerdings existiert in dieser Region der Sequenz kein derartiger Leserahmen. Solange aber weder biochemische noch biologische Daten für die tatsächliche Existenz eines Genes an dieser Stelle sprechen, kann nur vermerkt werden, daß es zwischen LP7 und P22 aufgrund der Sequenzdaten einen Unterschied gibt.

Über die Funktion der Fragmente Pst-D1 und Pst-D2 von LP7 wurden keine weiteren Untersuchungen angestellt. Auch die Frage, ob LP7 *in vivo* eine oder sogar beide zusätzlichen *pac* Signale zur Initiation der DNA-Verpackung benutzt, konnte nicht abschließend beantwortet werden. Es ist denkbar, daß LP7 (als eine Art "Zwischenstufe" zwischen Wildtyp P22 und HT12/4) gelegentlich an D1 und/oder D2 die Verpackung startet, jedoch mengenmäßig nicht so auffallend, wie dies bei HT12/4 der Fall ist (Casjens et al., 1987).

9. Zusammenfassung

1. In dieser Arbeit wurden eine Reihe von Bakteriophagen, die zur P22-Familie zählen, genetisch und biochemisch hinsichtlich ihres Verhaltens bei der DNA-Verpackung - als natürliche Varianten von P22 - miteinander verglichen; in diese Arbeit mit einbezogen wurden auch HT-Mutanten von P22, die als induzierte Varianten im Verpackungsverhalten im Vergleich mit dem Wildtyp zu verstehen sind.

2. Biologische Daten über die mit P22 verwandten, doppelsträngigen DNA-Bakteriophagen LP7, ES18h1, L, A1a, A2f, A3 und KB1 von Salmonella typhimurium :

- Morphologisch gleichen sich alle untersuchten Phagen mit Ausnahme von ES18h1 sehr stark; ebenso wie bei P22 sieht man in EM-Aufnahmen einen ikosaedrischen Kopf mit einem kurzen Schwanz; ES18h1 hingegen besitzt - ähnlich wie der Phage Lambda - einen langen, flexiblen Schwanz.

- Alle untersuchten Phagen sind heteroimmun zu P22 sieAB , nicht aber generell untereinander heteroimmun; ES18h1 und P22 sind nicht-reziprok zueinander heteroimmun, weil P22 auf ES18-lysogenen Stämmen wächst, umgekehrt aber ES18 nicht auf P22-lysogenen; LP7 verhält sich ähnlich wie Wildtyp-P22, so daß der Verdacht erhärtet wird, daß LP7 ein sie-analoges System hat; bei den übrigen Phagen deutet nichts auf die Existenz eines solchen Systems hin.

- Versuche zur Transduktion bakterieller Marker ergaben teilweise deutliche Unterschiede bei den einzelnen Phagen im Vergleich zu P22; alle geprüften Phagen gehören zur Gruppe der generell transduzierenden Phagen; die Unterschiede in den Transduktionsraten deuten auf Unterschiede in der Spezifität bei der Initiation der DNA-Verpackung hin.

- Hinsichtlich der interessanten Frage nach der (gemeinsamen) Evolution dieser Gruppe von Phagen brachten marker-rescue-Experimente einige aufschlußreiche Ergebnisse: mit Ausnahme von ES18h1 und KB1 wurden alle geprüften Marker von P22 amber-Phagen ersetzt; ES18h1 restaurierte amber-Defekte von "frühen" Genen von P22, was bei den doch relativ starken morphologischen Unterschieden zunächst überraschte; KB1 vermag keinen der geprüften Defekte zu ersetzen.

3. Biochemische und genetische Untersuchungen der genannten Phagen mit besonderer Berücksichtigung von LP7 und P22 HT-Mutanten:

- Der Vergleich der Protein- und DNA-Muster der untersuchten Phagen bestätigte (bis auf ES18h1) die mit anderen Mitteln erhaltenen Befunde, daß es sich um mehr oder minder eng verwandte Phagen handelt.

- Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden der Phage LP7 als natürliche und eine Reihe von P22 HT-Mutanten als induzierte Varianten des Modellphagen P22 intensiv untersucht; wesentliche Aufschlüsse dazu ergab das Studium der Plasmidtransduktion unter erf recA Bedingungen von Klonen mit verschiedenen Fragmenten aus dem Genom von LP7; dabei wurden - im Gegensatz zu P22, von dem nur ein Fragment, das die P22 pac site enthält, transduziert wird - drei PstI-Fragmente (C, D1 und D2) mit Signalen für eine Plasmidtransduktion gefunden; die Transduktionsraten der drei LP7-Klone sind unterschiedlich; es ist nicht eindeutig erwiesen, ob LP7 in vivo alle drei pac Signale tatsächlich benutzt.

- Die Sequenzanalyse der Gene 3 und 2 von LP7 ergab, daß über weite Strecken dieser Gene (soweit sie mit P22 vergleichbar waren) ein sehr hoher Homologiegrad festzustellen ist (92.2 %), daß aber auch einige auffällige Unterschiede zu beobachten sind an Stellen der Sequenz von Gen 3 bzw. von Genprodukt 3, die sehr wahrscheinlich mit der Spezifität des Proteins für die pac site verknüpft sind.

- Die Sequenzanalyse der Gene 3 der drei HT-Mutanten HT17/1, HT103/2 und HT102/3 sowie die Einbeziehung der entsprechenden Sequenzen von zwei weiteren HT-Mutanten (HT12/4 und HT13/4) in den Vergleich verdichtete den für die Spezifität kritischen Abschnitt von Genprodukt 3 auf drei Bereiche um die Aminosäuren an Position 81, 91 und 113, da dort die Abweichungen von der Wildtypsequenz gehäuft auftreten; bei den Änderungen handelt es sich meistens um solche, die zu einer Ladungsverschiebung des Proteins führen, da negativ geladene Aminosäuren durch neutrale ersetzt sind (oder umgekehrt); vergleicht man die Hydrophilitätsmuster dieser Genprodukte, erkennt man entsprechende Veränderungen.

- Die detaillierte Sequenzanalyse des Bereiches aus dem Fragment PstI-D1 von LP7, der durch die Plasmidtransduktion gefunden wurde, und der Vergleich mit den genannten Gen 3 Sequenzen führte zur Ermittlung einer Folge von 16 Purinen bzw. Pyrimidinen, die allen geprüften transduzierbaren Fragmenten gemeinsam ist; aufgrund von Überlegungen zur Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer solchen Folge liegt der Schluß nahe, daß dieser Bereich für die spezifische pac Erkennung mindestens kritisch ist; vorläufig können allerdings keine definitiven Aussagen über Art der Interaktion von Genprodukt 3 mit dieser Sequenz gemacht werden und ob eventuell weitere Basenfolgen die pac Erkennung beeinflussen oder modulieren.

- Zwischen den mehr oder minder analogen Funktionen 3/2 der P22-Familie und Nu1/A von Lambda konnten weder signifikante Sequenzhomologien noch Ähnlichkeiten im Hydrophilizitätsmuster festgestellt werden.

10. Literatur

Adams M, M Hayden, S Casjens (1983) On the Sequential Packaging of Bacteriophage P22 DNA. J Virology 46 673-677

Anderson TF (1961) On the fine structure of the temperate bacteriophages P1, P2 and P22. Proc European Regional Conference Electron Microscopy (Delft) 1960; Uppsala

Backhaus H (1984) Analyse von Signalstrukturen und Genen für den Start der sequentiellen DNA-Verpackung, Transkriptionskontrolle und die DNS-Replikation beim Bakteriophagen P22. Habilitationsschrift, Universität MÜnchen

Backhaus H (1985) DNA Packaging Initiation of Salmonella Bacteriophage P22: Determination of Cut Sites Within the DNA Sequence Coding for Gene 3 . J Virology 55 458-465

Backhaus H, H Schmieger (1979a) Replication and Maturation of P22 in a Mutant of Salmonella typhimurium Temperature Sensitive in Initiation of DNA Replication. Molec Gen Genet 171 295-299

Backhaus H, H Schmieger (1979b) Bacterial DNA Synthesized Under Phage Control in a DNA-Defective Salmonella-Mutant and Packaged Into a Special Fraction of Transducing Particles of Phage P22. Mol Gen Genet 171 301-306

Backhaus H, JB Petri (1984) Sequence analysis of a region from the early right operon in phage P22 including the replication genes 18 and 12 . Gene 32 289-303

Behnisch W, H Schmieger (1985) In vitro packaging of plasmid DNA oligomers by Salmonella phage P22: Independence of the pac site, and evidence for the termination cut in vitro. Virology 144 310-317

Berg JM (1986a) Potential Metal-Binding Domains in Nucleic Acid Binding Proteins. Science 232 485-487

Berg JM (1986b) More metal-binding fingers. Nature 319 264-265

Bezdek M, P Amati (1967) Properties of P22 and a related Salmonella typhimurium phage L. I. General features and host specificity. Virology 31 272-278

Biggin MD, TJ Gibson, GF Hong (1983) Buffer gradient gels and 35S Label as an aid to rapid DNA sequence determination. Proc Natl Acad Sci 80 3963-3965

Birnboim HC, J Doly (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7 1513-1523

Bochner B, H-C Huang, GL Schieren, B Ames (1980) Positive Selection for Loss of Tetracycline Resistance. J Bacteriology 143 926-933

Boro H, JE Brenchley (1971) A new generalized transducing phage for Salmonella typhimurium LT-2. Virology 45 835-836

Botstein D (1968) Synthesis and maturation of phage P22 DNA. I. Identification of intermediates. J Mol Biol 34 621-641

Botstein D (1980) A theory of modular evolution for bacteriophages. Annals New York Academy of Sciences 1980:484-491

Botstein D, MJ Matz (1970) A recombination function essential to the growth of bacteriophage P22. J Mol Biol 54 417-440

Botstein D, I Herskovitz (1974) Properties of hybrids between Salmonella phage P22 and coliphage lambda. Nature 251 584-589

Boyd JSK (1950) The symbiotic bacteriophages of Salmonella typhimurium . J Path and Bact 62 501-517

Boyd JSK, DE Bidwell (1957) The type A phages of Salmonella typhimurium by standardized cross-immunity test: Identification. J Gen Microbiol 16 217-227

Callow B (1959) A new phage-typing scheme for Salmonella typhimurium . J Hyg 57 346-359

Campell A, D Botstein (1983) Evolution of the lambdoid phages. In: Lambda II (ed. by R Hendrix et al.) Cold Spring Harbor, N.Y., 365-380

Casjens S, WM Huang (1982) Initiation of Sequential Packaging of Bacteriophage P22 DNA. J Mol Biol 157 287-298

Casjens S, WM Huang, M Hayden, R Parr (1987) Initiation of Bacteriophage P22 DNA Packaging Series: Analysis of a Mutant which Alters the DNA Target Specificity of the Packaging Apparatus. J Mol Biol 194 411-422

Chelala CA, P Margolin (1974) Effects of deletions on cotransduction linkage in Salmonella typhimurium : evidence that bacterial chromosome deletions affect the

formation of transducing DNA fragments. Mol Gen Genet 131 97-112

Chelala CA, P Margolin (1976) Evidence that HT mutant strains of bacteriophage P22 retain an altered form of substrate specificity in the formation of transducing particles in Salmonella typhimurium . Genet Research 27 315-322

Chen EJ, PH Seeburg (1985) Supercoil Sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. DNA 4 165-170

Chou PY, GD Fasman (1974) Conformational parameters for amino acids in helical, ß-sheets and random coil regions calculated from proteins. Biochemistry 13 211-222

Clewell DB (1972) Nature of colE1 plasmid replication in Escherichia coli in the presence of chloramphenicol. J Bacteriology 110 667-676

Cohen NS, CY Chang, L Hsu (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R factor DNA. Proc Natl Acad Sci 69 2110-2114

Deans RJ, EN Jackson (1979) Restriction endonuclease HindIII cleavage site map of bacteriophage P22. Virology 95 359-372

Deichelbohrer I, W Messer, TA Trautner (1982) Genome of Bacillus subtilis Bacteriophage SPP1: Structure and Nucleotide Sequence of pac , the Origin of DNA Packaging. J Virol 42 83-90

Earnshaw WC, S Casjens (1980) DNA packaging by the double stranded DNA bacteriophages. Cell 21 319-331

Ebel-Tsipis J, D Botstein (1971) Superinfection Exclusion by P22 Prophage in Lysogens of Salmonella typhimurium . I. Exclusion of Generalized Transducing Particles. Virology 45 629-637

Ebel-Tsipis J, D Botstein, MS Fox (1972) Generalized Transduction by Phage P22 in Salmonella typhimurium . I. Molecular Origin of Transducing DNA. J Mol Biol 71 433-448

Erikson V, SB Svenson, J Lönngren, AA Lindberg (1979) Salmonella phage glycanases: Substrate specificity of the phage P22 endorhamnosidase. J Gen Virol 43 503-511

Feiss M, A Becker (1983) DNA Packaging and Cutting. In: Lambda II (ed. by R Hendrix et al.) Cold Spring Harbor, N.Y., 305-330

Furth ME, JL Yates (1978) Specificity determinants for bacteriophage lambda DNA replication. II. Structure of O proteins of lambda-Ø80 and Ø80-lambda hybrid phages and of a mutant defective in the origin of replication. J Mol Biol 126 227-240

Furth ME, SH Wickner (1983) Lambda DNA Replication. In: Lambda II (ed. by R Hendrix et al.). Cold Spring Harbor, N.Y.

Garoff H, W Ansorge (1981) Improvement of DNA Sequencing Gels. Anal Biochem 115 450-457

Garnier J, DJ Osguthorpe, B Robson (1978) Analysis of the Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins. J Mol Biol 120 97-120

Grosschedl R, G Hobom (1979) DNA sequences and structural homologies of the replication origins of lambdoid bacteriophages. Nature 277 621-633

Guo LH, R Wu (1983) Exonuclease III: Use for DNA Sequence Analysis and in Specific Deletions of Nucleotides. Methods in Enzymology 100 60-96

Harrison, SC (1986) Fingers and DNA-Turns. Nature 322 587-598

Henikoff S (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28 351-359

Hilliker S (1981) Characterization of the Salmonella phage L early genes using immL hybrid phages. Virology 114 161-174

Hilliker S, D Botstein (1976) Specificity of genetic elements controlling regulation of early functions in temperate bacteriophages. J Mol Biol 106 537-566

Hobom G, R Grosschedl, M Lusky, G Scherer, E Schwarz, H Kössel (1979) Functional analysis of the replicator structure of lamboid bacteriophage DNAs. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Vol. XLIII/1:165-178

Howard BD (1967) Phage Lambda mutants deficient in rII exclusion. Science 158 1588-1589

Jackson EN, HJ Miller, JL Adams (1978) EcoRI restriction endonuclease cleavage site map of bacteriophage P22 DNA. J Mol Biol 118 347-363

Jackson EN, F Laski, C Andres (1982) P22 mutants which alter the specificity of DNA packaging. J Mol Biol 154 551-563

Jeppesen PGN (1974) A method for separating DNA fragments by electrophoresis in polyacrylamide concentration gradient. Anal Biochem 58 195-207

Johnson DA, JW Gautsch, JR Sportsman, JH Elder (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. Gene Anal Techn 1 3-8

Kinkeldey U (1978) Transduktionsspendermutanten im System Salmonella typhimurium /Phage P22. Dissertation Universität München

Kinkeldey U, D von Lieres, H Schmieger (1978) Bacterial Donor Mutants Affecting the Efficiency of Generalized Transduction by Salmonella Phage P22. J Gen Microbiol 108 227-237

Kitamura J, K Mise (1970) A new generalized transducing phage in Salmonella. Jap J Med Sci Biol 23 99-102

Klinkert J, A Klein (1979) Cloning of the replication gene P of bacteriophage Lambda: Effects of increased P-protein synthesis on cellular and phage DNA replication. Mol Gen Genet 171 219-227

Kröger M, G Hobom (1982) A chain of interlinked genes in the ninR region of bacteriophage lambda. Gene 20 25-38

Kufer B, H Backhaus, H Schmieger (1982) The packaging initiation site for phage P22. Analysis of packaging events by transduction. Mol Gen Genet 187 510-515

Kuo TT, BAD Stocker (1970) ES18, a general transducing phage for smooth and non-smooth Salmonella typhimurium . Virology 42 621-632

Kyte J, RF Doolittle (1982) A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. J Mol Biol 157 105-132

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 680-685

Larson R, J Messing (1982) Apple II software for M13 shotgun DNA sequencing. Nucleic Acids Res 10 39-49

Laski F, EN Jackson (1982) Maturation Cleavage of Bacteriophage P22 DNA in the Absence of DNA Packaging.

J Mol Biol 154 565-579

Lederberg EM, SN Cohen (1974) Transformation of Salmonella typhimurium by plasmid deoxyribonucleic acid. J Bacteriology 119 1072-1074

Liebeschuetz J, D Ritchie (1986) Phage T1-mediated Transduction of a Plasmid Containing the T1 pac site. J Mol Biol 192 681-692

Lindahl G, G Sironi, H Bialy, R Calendar (1970) Bacteriophage Lambda abortive infection of bacteria lysogenic for phage P2. Proc Nat Acad Sci 66 587-594

Maniatis T, EF Fritsch, J Sambrook (1982) Molecular cloning. Cold Spring Harbor, N.Y.

Maxam A, W Gilbert (1977) A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci 74 560-564

Maxam A, W Gilbert (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavage. Meth in Enzymology 65/I 499-559

Meinkoth J, G Wahl (1984) Hybridization of Nucleic Acids immobilized on solid support. Anal Biochem 138 267-284

Messing J (1983) New M13 vectors for cloning. Methods in Enzymology 101 20-78

Messing J, R Crea, PH Seeburg (1981) A system for shotgun DNA sequencing. Nucleic Acids Res 9 309-321

Miller JH (1972) Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.

Miller J, AD McLachlan, A Klug (1986) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. EMBO J 4 1609-1614

Moore DD, K Denniston-Thompson, ME Furth, FR Blattner (1977) Construction of chimeric phages and plasmids containing the origin of replication of bacteriophage Lambda. Science 198 1040-1045

Moore DD, K Denniston-Thompson, KE Kruger, ME Furth, BG Williams, DL Daniels, FR Blattner (1979) Dissection and comparative anatomy of the origins of replication of lambdoid phages. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Vol. XLIII/1155-163

Morse ML, EM Lederberg, J Lederberg (1956) Transduction in Escherichia coli K12. Genetics 41 142-156

Norrander J, T Kempe, J Messing (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene 26 101-106

Orbach MJ, EN Jackson (1982) Transfer of chimeric plasmids among Salmonella typhimurium strains by P22 transduction. J Bacteriol 149 985-994

Ozeki H (1959) Chromosome fragments participating in transduction in Salmonella typhimurium. Genetics 44 457-470

Pabo CO, RT Sauer (1984) Protein-DNA Recognition. Ann Rev Biochem 53 293-321

Peacock AC, CW Dingmann (1968) Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acids by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gels. Biochem 7 668-674

Petri JB, H Backhaus (1984) Structural organization of the ori site of phage P22; comparison with other lambdoid ori sites. Gene 32 304-310

Poteete AR, J King (1977) Functions of two new genes in Salmonella phage P22 assembly. Virology 76 725-739

Poteete AR, V Jarvik, D Botstein (1979) Encapsulation of phage P22 DNA in vitro . Virology 95 550-564

Poteete AR, D Botstein (1979) Purification and properties of proteins essential to DNA encapsulation by phage P22. Virology 95 565-573

Rao N (1968) Bacteriophage P22 controlled exclusion in Salmonella typhimurium . J Mol Biol 35 607-622

Rhoades M, LA MacHattie, CA Thomas jr (1968) The P22 bacteriophage molecule I. The mature form. J Mol Biol 37 21-40

Rutila J, EN Jackson (1981) A physical map of the bacteriophage P22 genome. Virology 113 769-775

Sanderson KE, JR Roth (1983) Linkage Map of Salmonella typhimurium . Edition VI. Microbiological Reviews 47 410-453

Sanger F, S Nicklen, AR Coulson (1977) DNA sequencing with chainterminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 74 5463-5467

Sanger F, AR Coulson, BG Barrell, AJH Smith, BA Roe (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. J Mol Biol 143 161-178

Sanger F, AR Coulson, GF Hong, DF Hill, GB Petersen (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage Lambda DNA. J Mol Biol 162 729-773

Schanda-Mulfinger UEM (1979) Beteiligung bakterieller Replikationsfunktionen an der DNS-Synthese des Salmonella Phagen P22. Dissertation Universität München.

Schanda-Mulfinger UEM, H Schmieger (1980) Growth of Salmonella Bacteriophage P22 in Escherichia coli (Ts) Mutants. J Bac 143 1042-1045

Schmidt C, H Schmieger (1984) Selective transduction of recombinant plasmids with cloned pac sites by Salmonella phage P22. Mol Gen Genet 196 123-128

Schmieger H (1971) A method for detection of phage mutants with altered transducing ability. Mol Gen Genet 110 378-381

Schmieger H (1972) Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. Mol Gen Genet 119 75-88

Schmieger H (1982) Packaging signals for phage P22 on the chromosome of Salmonella typhimurium . Mol Gen Genet 187 516-518

Schmieger H (1984) pac sites are indispensible for in vivo packaging of DNA by phage P22. Mol Gen Genet 195 252-255

Schmieger H, H Backhaus (1976) Altered Cotransduction Frequencies Exhibited by HT-Mutants of Salmonella Phage P22. Mol Gen Genet 143 307-309

Shine J, L Dalgarno (1974) The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense tripletts and ribosome binding sites. Proc Natl Acad Sci 71 1342-1346

Smith HO, M Levine (1965) Gene order in prophage P22. Virology 27 229-231

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98 503-517

Starlinger P (1958) Über einen Defekt des transduzierenden Salmonella-Phagen P22. Z Naturforsch 136 489-493

Streisinger G, J Emrich, MM Stahl (1967) Chromosome structure in phage T4. III. Terminal redundancy and length determination. Proc Natl Acad Sci 57 292-295

Strobel E (1981) Untersuchungen zur DNS-Verpackung beim Salmonella Phagen P22. Dissertation Universität München.

Strobel E, W Behnisch, H Schmieger (1984) In vitro packaging of mature phage DNA by Salmonella phage P22. Virology 133 158-165

Susskind MM, A Wright, D Botstein (1971) Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of Salmonella typhimurium . II. Genetic evidence for two exclusion systems. Virology 45 638-652

Susskind MM, D Botstein, A Wright (1974a) Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of Salmonella typhimurium . III. Failure of superinfecting phage DNA to enter sieA + lysogens. Virology 62 350-366

Susskind MM, A Wright, D Botstein (1974b) Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of Salmonella typhimurium . IV. Genetics and physiology of sieB exclusion. Virology 62 367-384

Susskind MM, D Botstein (1978) Molecular genetics of bacteriophage P22. Micobiological Reviews 42 385-413

Szybalski W, E Szybalski (1974) Visualization of the Evolution of Viral Genomes. In: Viruses, Evolution and Cancer. New York, San Francisco, 563-582

Teifel J, H Schmieger (1981) The Influence of Host DNA Replication on the Formation of Infectious and Transducing Mu-Particles. Mol Gen Genet 184 308-311

Teifel-Greding J (1984) Transduction of multi-copy plasmid pBR322 by bacteriophage Mu. Mol Gen Genet 197 169-174

Thomas CA, J Abelson (1966) The isolation and characterization of DNA from bacteriophage. In: Procedures in Nucleic Acids Research (ed. by Cantoni and Davis), New York, 553-561

Tsurimoto T, K Matsubara (1981) Purification of bacteriophage lambda O protein that specifically binds to the origin of replication. Mol Gen Genet 181 325-331

Tye BK, RK Chan, D Botstein (1974a) Packaging of an oversize transducing genome by phage P22. J Mol Biol 85 485-500

Tye BK, JA Huberman, D Botstein (1974b) Non-random circular permutation of phage P22 DNA. J Mol Biol 85 501-532

Vincent A (1986) TFIIIA and homologous genes. The "finger" proteins. Nucleic Acids Res 14 4385-4391

Vieira J, J Messing (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertional mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19 269-276

Walsh J, GG Meynell (1976) The isolation of non-excluding mutants of phage P22. J Gen Virol 1 581-582

Weaver S, M Levine (1977a) The timing of erf-mediated recombination in replication, lysogenization and the forming of recombinant progeny by Salmonella phage P22. Virology 76 19-28

Weaver S, M Levine (1977b) Recombinational circularization of Salmonella phage P22 DNA. Virology 76 29-38

Weaver S, M Levine (1978) Replication in situ and DNA encapsulation following induction of an excision-defective lysogen of Salmonella phage P22. J Mol Biol 118 389-411

Weaver LH, D Rennell, AR Poteete, BW Matthews (1985) Structure of phage P22 gene 19 lysozyme inferred from its homologoy with phage T4 lysozyme. Implications for lysozyme evolution. J Mol Biol 184 739-741

Wiggins BA, S Hilliker (1985a) Genetic and DNA mapping of the late regulation and lysis genes of Salmonella bacteriophage P22 and coliphage lambda. J Virology 56 1030-1033

Wiggins BA, S Hilliker (1985b) Map of DNA homology between the genomes of Salmonella bacteriophages P22 and L. J Virology 56 1034-1036

Winnacker EL (1984) Gene und Klone. Verlag Chemie, Weinheim

Yanisch-Perron C, J Vieira, J Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33 103-119

Youderian P, MM Susskind (1980) Identification of the products of bacteriophage P22 genes, including a new late gene. Virology 107 258-269

Zinder ND (1955) Bacterial transduction. J Cell Comp Physiol 45 (Suppl.2)23-49

Zinder ND, J Lederberg (1952) Genetic exchange in Salmonella. J Bacteriology 64 679-699

Zahn K, FR Blattner (1985) Binding and bending of the lambda replication origin by the phage O protein. EMBO J 4 3605-3616

Danksagung

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich am Ende bei Herrn Prof. Dr. Horst Schmieger für die Anregung zu und die Anleitung während dieser Arbeit und die Möglichkeit, am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München arbeiten zu können.

Des weiteren bedanke ich mich bei den Kollegen und Mitarbeitern im Labor für anregende Diskussionen, Rat und Hilfe und mitmenschliches Engagement. Besonders erwähnen und danken möchte ich jedoch Herrn Dr. Horst Backhaus, Frau Dr. Ingrid Sadler, Frau Anita Meierl und Frau Ursula Hamker aus dem Institut, Frau Dr. Susanne Modrow vom Max-von-Pettenkofer-Institut, München, Frau I. Scholz vom MPI für Biochemie in Martinsried, Herrn Dr. Thomas Werner, GSF in Neuherberg und Herrn Volker Dittmar.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst Bonn-Bad Godesberg danke ich für die Möglichkeit, für vier Monate an der University of Minnesota at St. Paul, Minnesota, U.S.A. arbeiten und dabei neue Techniken erlernen zu können. Herrn Prof. Dr. Joachim Messing und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Gastfreundschaft und Hilfe in seinem Labor während dieses U.S.A.-Aufenthaltes.

Sie alle haben dazu beigetragen, daß mir die Arbeit stets Freude bereitet hat.

C U R R I C U L U M V I T A E

	Jean Bernhard P e t r i
geboren am	28. November 1954 in Paris
Eltern	Johann Petri, Montagemeister, und Edeltraud Petri, geb. Freymüller, Hausfrau
Schule	1961-1965 Volksschule in München 1965-1974 Humanistisches Wilhelmsgymnasium München Mai 1974 Abitur
Wehrdienst	Juli 1974 - September 1975
Studium	WS 1975 Beginn des Studiums der Philosophie an der Hochschule für Philosophie S.J. München und der Biologie an der Ludwigs - Maximilians - Universität München SS 1980 Magister Artium der Philosophie Magisterarbeit über den Beweis bei Ludwig Wittgenstein SS 1980 Diplomprüfung in Biologie (Hauptfach Molekulargenetik) SS 1982 Abschluß der Diplomarbeit in Biologie "Feinkartierung, DNS - Sequenzierung und Klonierung des Replikations-Origins des Salmonella thyphimurium Bakteriophagen P22" WS 1982 - WS 1983 Doktoratsstudium der Philosophie an der Leopold - Franzens - Universität Innsbruck "Ludwig Wittgenstein und der mathematische Grundlagenstreit" Promotion zum Dr. phil. im Mai 1984 seit Dezember 1982 Doktorarbeit in Biologie am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwigs - Maximilians - Universität München Juni bis Oktober 1984 Forschungsaufenthalt an der University of Minnesota, U.S.A. im Labor von Prof. Dr. J. Messing